

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/22439
G01N 33/74		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07692		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 13. Oktober 1999 (13.10.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 47 690.6 15. Oktober 1998 (15.10.98) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): B.R.A.H.M.S DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Komturstrasse 19-20, D-12099 Berlin (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): BERGMANN, Andreas [DE/DE]; Baumläuferweg 47, D-12351 Berlin (DE). STRUCK, Joachim [DE/DE]; Holsteinische Strasse 28, D-12161 Berlin (DE). WEGLÖHNER, Wolfgang [DE/DE]; Lorenzweg 2, D-12099 Berlin (DE).		
(74) Anwälte: ANDRAE, Steffen; Andrae Flach Haug, Balanstrasse 55, D-81541 München (DE) usw.		

(54) Title: METHOD AND SUBSTANCES FOR DIAGNOSIS AND THERAPY OF SEPSIS AND SEPSIS-LIKE SYSTEMIC INFECTIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND SUBSTANZEN FÜR DIE DIAGNOSE UND THERAPIE VON SEPSIS UND SEPSISÄHNLICHEN SYSTEMISCHEN INFektIONEN

(57) Abstract

The invention relates to applications of recombinant procalcitonin 3-116 for the diagnosis and therapy of septic diseases and to the measurement of prohormones different from procalcitonin and dipeptidyl peptidase IV as biomarker in the diagnosis of sepsis.

(57) Zusammenfassung

Verwendungen von rekombinantem Procalcitonin 3-116 im Rahmen der Diagnose und Therapie von septischen Erkrankungen sowie die Messung von anderen Prohormonen als Procalcitonin sowie von Dipeptidyl Peptidase IV als Biomarker im Rahmen der Sepsisdiagnose.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

- 1 -

Verfahren und Substanzen für die Diagnose und Therapie von Sepsis und sepsisähnlichen systemischen Infektionen

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten, die sich aus neuen, experimentell abgesicherten Erkenntnissen im Zusammenhang mit dem Auftreten von Procalcitonin bzw. Procalcitonin-Teilpeptiden bei Sepsis und sepsisähnlichen schweren systemischen Infektionen ableiten ließen.

Aus den Patenten DE 42 27 454 bzw. EP 0 656 121 B1 bzw. US 5,639,617 ist es bekannt, daß die Bestimmung des Prohormons Procalcitonin bzw. von sich davon ableitenden Teilpeptiden in einem Serum oder Plasma eines Patienten, bei dem ein Sepsisrisiko besteht bzw. bei dem sepsistypische Krankheitserscheinungen festgestellt werden, ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel zur Früherkennung, d.h. zur Erkennung von Infektionen, die zu Sepsis führen können, und deren Abgrenzung von nicht-infektiösen Ätiologien, zur Erkennung des Schweregrads und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung von Sepsis und sepsisähnlichen systemischen Infektionen darstellt. Besonders wertvoll hat sich die genannte Bestimmung zur differentialdiagnostischen Unterscheidung von

Krankheitserscheinungen, die auf systemische mikrobielle Infektionen zurückzuführen sind, von anderen Krankheitserscheinungen nicht-infektiöser Ätiologie erwiesen, die aufgrund ihres klinischen Erscheinungsbildes auf eine Sepsis hindeuten könnten, jedoch in Wirklichkeit nicht auf eine systemische mikrobielle Infektion zurückzuführen sind, z.B. von Krankheitserscheinungen, die auf nicht-infektiöse Entzündungen einzelner Organe, auf postoperative Abstoßungsreaktionen oder Krebserkrankungen zurückzuführen sind. Auch können systemische Entzündungen von lokalen abgegrenzt werden.

Bezüglich eines Überblicks über den jüngeren Erkenntnisstand wird verwiesen auf W. Karzai et al. in Infection, Vol. 25 (1997), 6, S. 329-334 und die darin zitierte bzw. erwähnte weitere Fachliteratur.

Procalcitonin ist bekanntgeworden als Prohormon von Calcitonin, und seine vollständige Aminosäuresequenz ist seit längerem bekannt (FEBS 167 (1984), S. 93-97). Procalcitonin wird unter normalen Umständen in den C-Zellen der Schilddrüse produziert und dann spezifisch in das Hormon Calcitonin sowie die weiteren Teilpeptide Katacalcin und einen N-terminalen Rest aus 57 Aminosäuren ("Aminoprocalcitonin") gespalten.

Da bei Sepsis stark erhöhte Procalcitonin-Spiegel auch bei Patienten beobachtet werden, denen die Schilddrüse völlig entfernt wurde, mußte der Schluß gezogen werden, daß das im Blut von Sepsispatienten nachweisbare Procalcitonin außerhalb der Schilddrüse gebildet wird, wobei bezüglich der Organe bzw. Zellen oder der Gewebe, die für die Procalcitonin-Produktion bei Sepsis bestimmend sind, in der Fachliteratur unterschiedliche Vermutungen, die teilweise durch experimentelles Material gestützt wurden, geäußert wurden.

Was die Natur des bei Sepsis als "Procalcitonin" bestimmten

- 3 -

Peptids angeht, so wurde zwar in den o.g. Patenten von Anfang an klargestellt, daß das bestimmte Peptid nicht völlig mit dem bekannten Procalcitonin-Peptid voller Länge identisch sein muß, das in den Schilddrüsen als Calcitonin-Vorläufer gebildet wird. Die Frage, ob sich das im Falle von Sepsis gebildete Procalcitonin von dem in den Schilddrüsen gebildeten Procalcitonin unterscheidet, blieb jedoch bisher ungeklärt. Als mögliche Unterschiede waren posttranslationalen Modifikationen des bekannten Procalcitonins wie Glykosylierungen, Phosphorylierungen oder Veränderungen der Primärstruktur denkbar, jedoch auch modifizierte, verkürzte oder verlängerte Aminosäuresequenzen. Da die bisher angewandten analytischen Bestimmungsverfahren keine Unterschiede zwischen dem als Calcitonin-Vorläufer bekannten Procalcitonin und dem bei Sepsis gebildeten Procalcitonin erkennen ließen, wurde vorläufig allgemein davon ausgegangen, daß das bei Sepsis gebildete Procalcitonin mit dem Calcitonin-Vorläufer identisch ist und somit ein Peptid mit der bekannten Procalcitonin-Sequenz von 116 Aminosäuren (Procalcitonin 1-116) darstellt.

Wie die nachfolgend im experimentellen Teil dieser Anmeldung genauer erläuterten Bestimmungen im Labor der Anmelderin ergeben haben, unterscheidet sich das bei Sepsis gebildete Procalcitonin jedoch zwar geringfügig, jedoch signifikant von dem in der Schilddrüse gebildeten vollständigen Procalcitonin 1-116. Aus den festgestellten Unterschieden ergaben sich dann eine Reihe von wissenschaftlichen Schlußfolgerungen, die in neue diagnostische und therapeutische Verfahren, darin verwendbare Substanzen bzw. weiterverfolgbare wissenschaftliche Ansätze umgesetzt werden konnten.

Ausgangspunkt für den in der vorliegenden Patentanmeldung offenbarten Erfindungskomplexes ist die überraschende Erkenntnis, daß das bei Sepsis und sepsisähnlichen systemischen Infektionen im Serum von Patienten in vergleichsweise hohen Konzentrationen nachweisbare Procalcitonin nicht das

- 4 -

vollständige Procalcitonin 1-116 mit 116 Aminosäuren ist, sondern ein am Aminoterminus um ein Dipeptid verkürztes, ansonsten jedoch identisches Procalcitonin mit einer Aminosäuresequenz von nur 114 Aminosäuren (Procalcitonin 3-116).

Das gegenüber dem vollständigen Procalcitonin fehlende Dipeptid weist die Struktur Ala-Pro auf. Das Fehlen eines Dipeptids mit einem Prolinrest als zweite Aminosäure des Amino-Terminus des vollständigen Procalcitoninsequenz gab Anlaß zu der Vermutung, daß bei der Erzeugung des bei Sepsis nachweisbaren Procalcitonins 3-116 möglicherweise eine bestimmte Peptidase eine Rolle spielt, und zwar die sogenannte Dipeptidyl-(Amino)-Peptidase IV (DP IV oder DAP IV bzw. CD26).

Zur Bestimmung einer möglichen Rolle der Dipeptidyl-Aminopeptidase IV im Rahmen von systemischen Infektionen bzw. von Sepsis haben die Erfinder daher experimentell geprüft, ob eine Korrelation der physiologischen DAP IV Konzentrationen mit dem Nachweis einer Sepsis möglich ist. Die erhaltenen Ergebnissen zeigten eine derartige Korrelation.

Aus den erhaltenen genaueren Ergebnissen wurde ferner eine Hypothese entwickelt, daß das Auftreten hoher Procalcitonin-Konzentrationen bei Sepsis und systemischen Infektionen möglicherweise keine isolierte Erscheinung ist, sondern daß in ähnlicher Weise auch erhöhte Konzentrationen anderer Prohormone meßbar sein könnten, so daß die Bestimmung derartiger Prohormone eine mögliche Alternative zur Procalcitonin-Bestimmung darstellt bzw. geeignet ist, die Procalcitonin-Bestimmung in Einzelfällen zu ergänzen oder in diagnostisch signifikanter Weise weiter abzusichern.

Die Erkenntnis, daß bei Sepsis nicht das vollständige Procalcitonin 1-116 im Serum von Patienten gefunden wird, sondern ein verkürztes Procalcitonin 3-116, ist schließlich auch von potentiellem Interesse für die Sepsis-Therapie. In

- 5 -

einem Artikel von Eric S Nylen et al., Crit Care Med 1998, Vol. 26, No. 6, S. 1001-1006 werden experimentelle Befunde beschrieben, die darauf hindeuten, daß das bei Sepsis auftretende Procalcitonin nicht nur ein diagnostisch wichtiger Marker ist, der z.B. als Stoffwechsel-Abfallprodukt entstanden ist, sondern in einem infektiös bedingten Entzündungsgeschehen eine aktive Rolle als Mediator zu spielen scheint, indem Procalcitonin eine Entzündungsreaktion aufrechterhalten und verstärken kann. Diese Rolle von Procalcitonin wird gegenwärtig kontrovers diskutiert, und die bekannt gewordenen Versuchsergebnisse ergeben kein einheitliches Bild.

Die o.g. Erkenntnis, daß bei Sepsis ein am Aminoterminus um zwei Aminosäuren verkürztes Procalcitonin auftritt, legt nunmehr die Vermutung nahe, daß das Procalcitonin, das im Falle von Sepsis und anderen entzündlichen systemischen Infektionen eine aktive Rolle spielt, dieses verkürzte Procalcitonin 3-116 sein dürfte, und daß Untersuchungen, die mit dem Procalcitoninpeptid voller Länge durchgeführt wurden, u.a. aus diesem Grunde abweichende oder widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Es ist durchaus bekannt, daß viele physiologisch aktive Peptide durch Spaltung, z.B. eine einleitende Abspaltung eines kurzen Peptidrests, in ihre eingentliche aktive Form überführt werden. Ein bekanntes Beispiel ist Angiotensin, bei dem aus dem nichtaktiven Angiotensinogen mit 14 Aminosäuren durch sukzessive Abspaltung erst eines Tetrapeptids und dann eines Dipeptids sowie schließlich einer einzelnen Aminosäure Peptide mit erheblich unterschiedlichen physiologischen Aktivitäten gebildet werden. Daß relativ geringfügige Modifikationen am N-Terminus von physiologisch aktiven Peptiden im Rahmen des Immunogeschehens eine Rolle spielen und zu erheblichen Aktivitätsveränderungen bei den entsprechenden Peptiden führen können, wird durch eine Reihe von Veröffentlichungen aus der jüngsten Zeit unterstrichen, in denen jedoch keine Beziehung zu septischen Krankheitsgeschehen hergestellt wird (vgl.

- 6 -

z.B. J Immunol 1998, Sept. 15, 161(6):2672-5; Biochemistry 1998, Sept. 8, 37(36): 12672-80; FEBS Lett 1998, Juli 31, 432 (1-2):73-6; J Biol Chem 1998, März 27; 273 (13):7222-7; J Exp Med 1997, Dec 1; 186(11):1865-72).

Nimmt man an, daß Procalcitonin 3-116 aktiv an einem Entzündungsgeschehen beteiligt ist und für dieses verkürzte Procalcitonin spezifische molekulare Rezeptoren oder ähnliche spezifische Binder existieren, eröffnen sich neue therapeutische Möglichkeiten zur Beeinflussung des Verlaufs einer Sepsis unter Einsatz des Procalcitonins 3-116 bzw. von Agonisten und Antagonisten, die mit den Rezeptoren für das Procalcitonin 3-116 wechselwirken und damit die von diesem ausgelösten physiologischen Reaktionen und damit auch ein Entzündungsgeschehen beeinflussen können. Auch der Einsatz von spezifischen Bindern von Procalcitonin 3-116, z.B. selektiven Antikörpern, stellt einen therapeutischen Ansatz dar, der durch die hierin vermittelten Erkenntnisse eröffnet wird.

Schließlich ergab sich daraus, daß die Dipeptidyl-Aminopeptidase IV bei der Generierung des Procalcitonins 3-116 bei Sepsis und systemischen Infektionen eine Rolle spielen könnte, eine weitere Hypothese, nämlich daß eine Sepsis oder ein sepsisähnliches Entzündungsgeschehen möglicherweise auch dadurch therapeutisch beeinflußt werden könnte, daß man die Dipeptidyl-Aminopeptidase IV in ihrer Wirkung beeinflußt, indem man sie z.B. durch geeignete selektive Binder, Antikörper oder ähnliche Rezeptoren-Moleküle blockiert.

Es ist Ziel der vorliegenden Patentanmeldung, die sich aus den obigen neuen Erkenntnissen und daraus abgeleiteten Schlußfolgerungen ergebenden neuen technischen Lehren patentrechtlich abzusichern, soweit diese unter Berücksichtigung des derzeitigen Erkenntnisstandes einem Patentschutz zugänglich sind.

Die beigefügten Patentansprüche fassen derartige schutzfähige Lehren vorläufig zusammen. Weitere schutzfähige Lehren können sich für den Fachmann aus dem Gesamttext der vorliegenden Anmeldung unter Berücksichtigung der im experimentellen Teil angeführten Versuchsbedingungen und Versuchsergebnisse sowie den zugehörigen Erläuterungen ergeben. Die Beanspruchung derartiger Lehren durch zusätzliche Ansprüche bleibt ausdrücklich vorbehalten.

Nachfolgend wird unter Bezugnahme auf mehrere Diagramme ausgewähltes experimentelles Material vorgelegt, das die neuen Erkenntnisse untermauert bzw. das für die Richtigkeit der daraus abgeleiteten Annahmen spricht.

In den Figuren zeigen:

Figur 1 die Ergebnisse einer Procalcitonin-Isolierung und Aufreinigung per HPLC aus einem Mischserum aus gesammelten Seren von verschiedenen Patienten mit schwerer Sepsis;

Figur 2 die Ergebnisse einer massenspektroskopischen Untersuchung derjenigen Fraktionen des Mischserums aus Fig.1, die eine hohe Procalcitonin-Immunreaktivität aufwiesen;

Figur 3 Ergebnisse der Bestimmung der Enzymaktivität von Dipeptidyl-Aminopeptidase IV in septischen Seren und Normalseren; sowie

Figur 4 die Ergebnisse der Bestimmung von Procalcitonin in septischen Seren und Normalseren in Gegenüberstellung mit Ergebnissen der Bestimmung eines weiteren Prohormons, nämlich pro-Gastrin-Releasing-Peptide (proGRP), in den gleichen Seren.

Figur 5 die Ergebnisse der Bestimmung von Procalcitonin in

- 8 -

Seren eines Kollektivs von 20 Normalpersonen sowie andererseits 20 Sepsispatienten.

Figur 6 die Ergebnisse der Bestimmung von Pro-ANF (in pg/Röhrchen) in den gleichen Kollektiven von Normalpersonen und Sepsispatienten wie in Figur 5.

Figur 7 die Ergebnisse der Bestimmung von Pro-ADM (in pg/Röhrchen) in den gleichen Kollektiven von Normalpersonen und Sepsispatienten wie in Figur 5.

Figur 8 die Ergebnisse der Bestimmung von Pro-END (in pg/Röhrchen) in den gleichen Kollektiven von Normalpersonen und Sepsispatienten wie in Figur 5.

Figur 9 die Ergebnisse der Bestimmung von Pro-BNP (in pg/Röhrchen) in den gleichen Kollektiven von Normalpersonen und Sepsispatienten wie in Figur 5.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Isolierung und Charakterisierung des endogenen Procalcitonin-Peptids aus Seren septischer Patienten

Durch Vermischen von Serumproben von verschiedenen Patienten mit schwerer Sepsis wurde ein Mischserum mit einem Gesamtvolumen von 68 ml hergestellt. Die Procalcitonin-Konzentratin in dem erhaltenen Mischserum wurde mit Hilfe eines kommerziellen Procalcitonin-Assays (LUMITest PCT, B.R.A.H.M.S Diagnostica) zu 280 ng/ml (Gesamtmenge 19 μ g) ermittelt. Das Mischserum wurde mit einem gleichen Volumen eines Puffers (68 ml; 10mM EDTA, 1 mg/ml Maus-IgG, 2 mg/ml Schaf-IgG, 2 mg/ml bovines IgG, 0,1 mMol Leupeptin, 50 μ M Amastatin in PBS) vermischt, und das in der Probe enthaltene Procalcitonin wurde affinitätschromatographisch isoliert und gereinigt.

Hierzu wurde die gesamte Mischprobe bei einer Durchflußrate von 0,5 ml/min viermal hintereinander über eine Affinitäts säule (0,5 x 1 cm, Anti-Calcitonin-Antikörper, gebunden an Carbolink der Firma Pierce, Procalcitonin-Bindekapazität ca. 20 µg) gepumpt. Anschließend wurde die Säule mit 30 ml PBS gewaschen, und das gebundene Peptid wurde mit Hilfe von 50 mM Essigsäure (pH ca. 2,0) eluiert. Der Säulenausfluß wurde kontinuierlich auf Absorption bei 280 nm überwacht, und die von der Essigsäure eluierte Proteinfraktion wurde aufgefangen (Endvolumen 2,0 ml).

Das auf diese Weise gesammelte Material wurde über Umkehrphasen-HPLC an einer rpC₁₈-Säule μ Bondapak 0,4 x 30 mm (Firma Waters) gereinigt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, Laufmittel und Elutionsbedingungen sind der folgenden Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Elutionsbedingungen rp-HPLC Procalcitonin

Laufmittel A:	5 % Acetonitril 20 mM NH ₄ -Acetat		
Laufmittel B:	90 % Acetonitril 20 mM NH ₄ -Acetat		
Gradient:	0,0 min 2,5 min 5,0 min 55,0 min 60,0 min	100 % A 100 % A 89 % A 56 % A 0 % A	0 % B 0 % B 11 % B 44 % B 100 % B

Der Säulenausfluß wurde kontinuierlich auf seine Absorption bei 214 nm vermessen und in Fraktionen von 0,25 ml gesammelt. Mit Hilfe eines handelsüblichen Procalcitonin-Assays (LUMItest PCT, B.R.A.H.M.S Diagnostica) wurden diejenigen Fraktionen bestimmt, in denen eine PCT-Immunreaktivität nachweisbar war. Es zeigte sich, daß die Haupt-Immunreaktivität in der 51. Fraktion als scharfe Bande eluiert wurde. Außerdem wurden heterogen zusammengesetzte Proteinfraktionen mit geringeren PCT-Immunreaktivitäten in den Fraktionen 39 bis 49 erhalten.

- 10 -

Figur 1 zeigt die ermittelte PCT-Immunreaktivität (ausgedrückt als ng PCT/ml) für die einzelnen gesammelten Fraktionen der rp HPLC-Chromatographie, überlagert einer Kurve, die die optische Dichte (OD) der eluierten Fraktionen darstellt.

Alle Fraktionen, die eine positive Procalcitonin-Immunreaktivität aufwiesen, wurden durch Begasen mit Stickstoff getrocknet. Anschließend wurden die Proben massenspektrometrisch analysiert und einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen.

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung (MALDI-TOF-Methode) wurde für die Fraktionen 50-52 das in Figur 2 gezeigte Profil erhalten, aus dem sich eine Molmasse von 12640 ± 15 ergab. Sämtliche anderen massenspektrometrisch untersuchten Fraktionen (36-49, 53-59) ergaben heterogene Massenverteilungen mit Molmassen <12640. Ihre Einzelmasse ergab im Vergleich zur Intensität der Masse der Fraktion 50-52 eine Intensität von <2 %. Damit wurde nachgewiesen, daß die Procalcitonin-Immunreaktivität in Seren von Sepsispatienten mit einer Masse von 12640 ± 15 assoziiert ist. Keine der gewonnenen Fraktionen wies eine höhere Masse auf.

Die in den Fraktionen 36-59 enthaltenen Peptide wurden einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen. Auch hierbei erwies sich der Inhalt der Fraktionen 36-49 und 53-59 als heterogen, d.h. es wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen N-Termini ermittelt.

Für die Fraktion 50-52, in denen die überwiegende Procalcitonin-Immunreaktivität zu finden war, ergab sich, daß die darin enthaltenen Peptide eindeutig folgenden N-Terminus (15 Aminosäuren) aufwiesen:

Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr Leu

Das Peptid aus den Fraktionen 50-52 wurde anschließend

- 11 -

mittels Protease Glu-C bzw. Trypsin verdaut, die entstandenen Fragmente wurden auf an sich bekannte Weise über SMART-HPLC gewonnen und anschließend massenspektrometrisch und sequenzanalytisch untersucht.

Es wurde eine Sequenz erhalten, die vollständig mit der Sequenz der Aminosäuren 3-116 des bekannten Procalcitonins 1-116 übereinstimmte. Die theoretische Masse dieser Sequenz betrug 12627, was mit der massenspektrometrisch ermittelten Masse von 12640 ± 15 übereinstimmt.

Damit wurde nachgewiesen, daß im Blut von Sepsispatienten ein Procalcitonin-Peptid zirkuliert, das 114 Aminosäuren umfaßt und als Procalcitonin 3-116 zu bezeichnen ist. Das Peptid ist nicht durch posttranskriptionale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Glykosylierungen verändert.

Das Procalcitonin 3-116 wurde bisher in der wissenschaftlichen Literatur noch nicht als mögliches endogenes Procalcitonin-Teilpeptid diskutiert, und es bestand daher bisher für den Fachmann auch noch keinerlei Veranlassung, dieses Peptid gezielt herzustellen und auf seine Eigenschaften zu untersuchen. Die obigen Befunde lieferten nunmehr jedoch einen Anlaß zur gezielten Herstellung des genannten Procalcitonin 3-116 nach gentechnologischen Techniken. Seine Herstellung wird nachfolgend beschrieben.

B. Klonierung, Expression und Aufreinigung von rekombinantem Procalcitonin 3-116.

1. Klonierung

Die für Procalcitonin 3-116 (nachfolgend abgekürzt PCT 114) codierenden DNA-Fragmente wurden unter Anwendung einer PCR-Amplifikation mit Hilfe geeigneter Oligonukleotidprimer aus einem humanen Schilddrüsen-cDNA-Pool isoliert. Das gewünschte Fragment wurde mittels gängiger Methoden (Ausubel FM,

- 12 -

Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, und Struhl K (1991), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) kloniert, und die korrekte Nukleotidsequenz wurde durch DNA-Sequenzierung und Vergleich mit der bekannten, für Procalcitonin codierenden DNA-Sequenz verifiziert.

Für die Expression der für PCT 114 codierenden cDNA wurde ein Vektor verwendet, der neben einem T7-Promotor eine Region enthält, die für das Signalpeptid des sog. pelB-Proteins codiert. Dieses pelB-Signalpeptid sorgt dafür, daß ein nach Klonierung und Expression entstandenes Fusionsprotein durch die cytoplasmatische Membran der für die Expression verwendeten Wirtzellen in den periplasmatischen Raum transportiert wird. Bei diesem Transportvorgang wird gleichzeitig das N-terminale Signalpeptid durch eine membranständige Signalpeptidase abgetrennt (Stader JA und Silhavy TJ (1990), Engineering Escherichia coli to secrete heterologous gene products, Methods Enzymol. 185, 166-187). Diese Vorgehensweise garantiert, daß das gefundene Expressionsprodukt exakt die gewünschte Sequenz aufweist. Bei dieser Vorgehensweise fehlt das bei anderen Methoden zur Expression notwendige N-terminale Methionin.

Nach der Klonierung der cDNA für PCT 114 in einen Vektor der genannten Art und der Transformierung von E. coli mit diesem Vektor wurde Procalcitonin 3-116 exprimiert. Die periplasmatische Fraktion mit dem exprimierten Procalcitonin 3-116 wurde auf an sich bekannte Weise isoliert (Neu HC und Heppel LA (1965), The release of enzymes from Escherichia coli by osmotic shock and during the formation of spheroblasts, J. Biol. Chem. 240, 3685-3692). Nach einer Zentrifugierung (100.000 g, 30 min, 4°C) und Filtration des flüssigen Überstands (0,2 µm) wurde das erhaltene Filtrat durch Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Die Fraktionen mit Procalcitonin-Immunreaktivität wurden vereinigt und über Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt, wie im Zusammenhang mit der

- 13 -

Isolierung von PCT 3-116 aus septischen Seren beschrieben wurde.

Alle Fraktionen mit Procalcitonin-Immunreaktivität wurden vereinigt und lyophilisiert. Wie eine Überprüfung des Materials mittels SDS-PAGE ergab, war das so gewonnene Material zu mindestens 95% sauber.

Die Identität des exprimierten und aufgereinigten Peptids als Procalcitonin 3-116 wurde durch Massenspektrometrie und Sequenzanalyse bestätigt.

Das erhaltene rekombinante Procalcitonin 3-116 stellt ein neues rekombinantes Peptid dar und kann in dieser Form zur Herstellung von Immunreagenzien verwendet sowie auf seine Eignung als Therapeutikum bzw. auf seiner Fähigkeit, im Sinne der o.g. Veröffentlichung (Eric S Nylen, a.a.O.) prophylaktisch und therapeutisch zu wirken, untersucht werden.

Zur Herstellung von Kalibratoren für PCT-Assays wurde das oben für die gentechnologische Herstellung von Procalcitonin 3-116 beschriebene Verfahren in im wesentlichen identischer Form auch zur Herstellung des vollständigen Procalcitonins 1-116 und des Procalcitonins 2-116 eingesetzt.

C. Ermittlung der Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (DAP IV)-Aktivität in humanen Normalseren bzw. Seren von Patienten mit schwerer Sepsis

Jeweils 20 Serumproben von gesunden Normalpersonen sowie von Sepsispatienten wurden auf ihre für Dipeptidyl-Aminopeptidase IV-spezifische Enzymaktivität untersucht. Die DAP IV-Enzymaktivität wurde auf an sich bekannte Weise fluorometrisch unter Verwendung von Lys-Pro-4-Methoxy-beta-naphthylamid vermessen. Dazu wurden jeweils 2 µl des zu überprüften Serums mit 3 ml Substrat (50 µg/ml Lys-Pro-4-Methoxy-

- 14 -

beta-naphylamid, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5) vermischt, und die auftretende Fluoreszenz wurde kontinuierlich unter Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm bei einer Emissionswellenlänge von 410 nm gemessen. Das Fluoreszenzsignal wurde mittels einer 4-Methoxy-naphthylamin-Lösung kalibriert. Die auf diese Weise ermittelte Enzymaktivität wird in nmol/-min angegeben.

Die erhaltenen Ergebnisse sind Figur 3 dargestellt.

Es ist klar zu erkennen, daß die DAP IV-Enzymaktivität in den Sepsis-Seren deutlich niedriger liegt als in den Seren von gesunden Normalpersonen (Blutspenderseren). Damit läßt sich die Bestimmung der DAP IV-Enzymaktivität im Plasma oder Serum auch zur Erkennung von Sepsis in Patientenserien heranziehen.

Die bei Sepsis deutlich erniedrigte Plasmakonzentration an DAP IV kann einerseits als Beleg dafür angesehen werden, daß DAP IV an einem Sepsis-Geschehen mitbeteiligt ist. Andererseits deuten die Ergebnisse darauf hin, daß es nicht die Konzentration an DAP IV im Plasma sein kann, die für die Bildung von Procalcitonin 3-116 verantwortlich ist. Die erhaltenen Ergebnisse legen vielmehr den Schluß nahe, daß Procalcitonin 3-116 durch gewebs- bzw. zellgebundene DAP IV, möglicherweise intrazellulär, gebildet und aus Procalcitonin-erzeugenden oder speichernden Zellen freigesetzt wird.

Die der Literatur entnehmbare Information, daß DAP IV von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, (vergleiche Hegen und Oravecz, Protein-Reviews on the WEB; Fleischer, a.a.O.) deutet auf einen engen Zusammenhang zwischen der Expression von DAP IV und dem Aktivierungszustand des Immunsystems hin, das bei einer septischen systemischen Infektion extrem belastet ist und daher typische Reaktionen zeigt, die sich u.a. in einer stark erhöhten Procalcitonin 3-116 Bildung äußern.

Abgesehen von den sich aus den obigen Befunden ergebenden Möglichkeiten, DAP IV im Rahmen der Sepsis-Diagnose zu bestimmen, können die obigen Ergebnisse auch darauf hindeuten, daß die bei einer Sepsis kaskadenartig ablaufenden Vorgänge durch DAP IV-Hemmstoffe therapeutisch zu beeinflußt werden können, wodurch es möglich sein könnte, die Freisetzung von Procalcitonin 3-116 sowie anderen Hormonen oder konvertierten Prohormonen unter Sepsis zu verhindern oder zu vermindern, so daß pathologische Konsequenzen dieser Prohormonfreisetzung verminderter oder vermieden werden können.

D. Bestimmung der Konzentrationen anderer Prohormone als Procalcitonin bei Sepsis

Die Tatsache, daß bei Sepsis nicht das vollständige Prohormon Procalcitonin, sondern ein modifiziertes, um ein Xaa-Pro-Dipeptid verkürzte Prohormon freigesetzt wird, führte zu der Hypothese, daß bei Sepsis nicht nur Procalcitonin 3-116 freigesetzt wird, sondern daß Procalcitonin 3-116 vielleicht nur ein Vertreter aus einer ganzen Gruppe von Prohormonen oder ähnlichen Peptiden, z.B. solchen mit immunmodulatorischen Eigenschaften, ist, die bei Sepsis in erhöhtem Maße und möglicherweise konvertierter Form freigesetzt werden.

Eine Überprüfung bekannter Prohormone und der für diese Prohormone der Literatur entnehmbaren Aminosäuresequenzen zeigte, daß tatsächlich bei den meisten bekannten Prohormonen am Aminoterminus ein Dipeptid zu finden ist, daß als Xaa-Pro definiert werden kann und das daher in einem ähnlichen Sinne, wie beim Procalcitonin beobachtet, abgespalten werden kann. Im einzelnen finden sich am Aminoterminus sehr vieler Prohormone oder Immunmodulatoren Dipeptide des genannten Typs. Die nachfolgende tabellarische Übersicht über Literaturdaten gibt einen Überblick über einige ausgewählte Prohormone bzw. Immunmodulatoren, das bei diesen zu am Amino-Terminus zu findende Dipeptid sowie ihre Gesamtzahl

der Aminosäuren.

Die in der Tabelle 2 aufgeführten Prohormone stellen Beispiele für Prohormone dar, deren Konzentrationen bei Sepsis erhöht sein können, ohne daß die Aufzählung als erschöpfend anzusehen ist. Bei den Immunmodulatoren ist mit einer Beeinflussung der Aktivität durch Abspaltung eines Dipeptids zu rechnen.

Tabelle 2:

Pro-Hormon/ Immunmodulator	Dipeptid am N-Terminus	Gesamtzahl aller Aminosäuren
pro-Endothelin-1 (pro-END)	Ala Pro	195
pro-Brain-Natriuretic- Peptide (pro-BNP)	His Pro	108
pro-Atrial-Natriuretic- Peptide (pro-ANP; auch pro-Atrialnatriuretischer Faktor, pro-ANF)	Asn Pro	128
pro-Leptin	Val Pro	146
pro-Neuropeptide Y	Tyr Pro	69
pro-Somatostatin	Ala Pro	92
pro-Neuropeptide YY	Thr Pro	69
Interleukin 6	Val Pro	183
Interleukin 10	Ser Pro	160
pro-Gastrin-Releasing Peptid (proGRP)	Val Pro	115
pro-Opiomelanocortin	Trp Cys	241
pro-Adrenomedullin (pro-ADM)	Ala Arg	164
Procalcitonin (PCT)	Ala Pro	116

Die bisherigen experimentellen Befunde deuten tatsächlich darauf hin, daß bei einer systemischen Infektion wie Sepsis generell Prohormone und/oder Peptid-Immunmodulatoren wie Interleukine, möglicherweise unter Modifizierung durch Abspaltung von Dipeptiden am Amino-Terminus, freigesetzt werden und daß diese durch Wechselwirkung mit zugehörigen spezifischen Rezeptoren oder anderen Bindern möglicherweise weitere Folgeschritte in der Kaskade einer Immunantwort auslösen.

- 17 -

Es wurde parallel zu einer Procalcitonin-Bestimmung in Normalseren und Seren von Sepsis-Patienten auch die Bestimmung weiterer Prohormone durchgeführt, die eher willkürlich ausgewählt ausgewählt worden waren. Es waren dies (i) das pro-Gastrin-Releasing Peptide (proGRP), (ii) das pro-Atrial-Natriuretic-Peptide (pro-ANP bzw. pro-ANF), (iii) das pro-Adrenomedullin (pro-ADM), (iv) das pro-Endothelin (pro-END) und (v) das pro-Brain-Natriuretic-Peptide (pro-BNP).

D.1. Bestimmung von proGRP in Seren von Sepsis-Patienten und von Normalpersonen

Für die Bestimmung von proGRP ist ein Assay im Handel. ProGRP wird in einer jüngeren Veröffentlichung als Tumormarker beim kleinzelligen Bronchialkarzinom beschrieben (Petra Stieber et al, J Lab Med 1997, 21(6):336-344). Der Assay zur Bestimmung von ProGRP wird von der Tonen Corporation unter der Bezeichnung ProGRP ELISA KIT™ im Handel angeboten.

Unter Verwendung dieses Kits wurden unter Einhaltung der Arbeitsweise, die in der Gebrauchsinformation des kommerziellen Kits vorgeschrieben ist, die in Figur 4 dargestellten Meßergebnisse erhalten.

Ein Vergleich der für Procalcitonin einerseits und ProGRP andererseits erhaltenen Werte zeigt, daß bei Procalcitonin die Unterscheidung zwischen Normalseren und Sepsis-Seren zwar eindeutiger ist, daß aber die ProGRP-Konzentrationen in weitgehend ähnlicher Weise erhöht ist wie die von Procalcitonin.

D.2. Bestimmung von pro-ANF, pro-ADM, pro-END und pro-BNP in Seren von Sepsis-Patienten und von Normalpersonen

Zur Bestimmung der (Prä-)Prohormone pro-ANF, pro-ADM, pro-END bzw. pro-BNP sind Assays der Firma DRG (DRG Instruments GmbH, D-35018 Marburg, Deutschland) in Kitform im Handel

- 18 -

erhältlich, die für die nachfolgenden Messungen unter Beachtung der Anweisungen der Hersteller verwendet wurden.

Im einzelnen wurden verwendet:

Zur Bestimmung von pro-ANF der Prepro-ANF 26-55 (human) RIA Kit, zur Bestimmung von pro-ADM der Pro-Adrenomedullin 45-92 (human) RIA, zur Bestimmung von pro-END der Prepro-Endothelin 18-50 (human) RIA Kit, und zur Bestimmung von Pro-BNP der Prepro-BNP 22-46 (human) RIA Kit der o.g. Firma DRG.

In den Seren eines Kollektivs von 20 Normalpersonen A-T sowie von 20 Sepsispatienten wurden die o.g. Prohormone sowie, parallel dazu, Procalcitonin bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Daten der Tabelle 3 sind außerdem auch noch in den Figuren 5 bis 9 graphisch veranschaulicht.

Die gezeigten Ergebnisse lassen bei allen gemessenen Prohormonen bei Sepsispatienten gegenüber Normalpersonen einen mehr oder weniger klar ausgeprägten Anstieg der Werte erkennen, wenn auch die Unterscheidung von Normalpersonen und Sepsispatienten bei der Bestimmung von Procalcitonin am ausgeprägtesten ist.

Bei einer ergänzenden Literaturrecherche wurde ferner eine Veröffentlichung in J. Endocr. (1988) 119, S.159-165 ermittelt, die sich mit der Charakterisierung von Pro-Opiomelanocortin- (POMC)-verwandten Peptiden bei septischem Schock befaßte. Es geht in der Veröffentlichung um die Frage einer erhöhten endogenen Opioid-Aktivität bei septischem Schock und deren Beeinflussung durch Verabreichung von Steroiden. Ein direkter Einfluß eines infektiösen Geschehens oder eine Beeinflussung der Meßwerte durch Antibiotika wird nicht diskutiert. Aufgrund der Fragestellung in der genannten Veröffentlichung besteht keine logische Möglichkeit zu einer verallgemeinernde Diskussion der berichteten Ergebnisse

- 19 -

unter Einbeziehung anderer Prohormon-Peptide. Erst angesichts der hierin offenbarten Lehre der vorliegenden Erfindung lässt sich die genannte Veröffentlichung retrospektiv als weiterer Hinweis auf eine generelle Erhöhung von Prohormonen bei Sepsis interpretieren.

Die Prüfung weiterer Prohormone ist angesichts der hierin offenbarten Ergebnisse als Routinemaßnahme anzusehen, und wenn derartige Prüfungen zu positiven Ergebnissen führen und die Bestimmung derartiger weiterer Prohormone zur Sepsisdiagnose verwendet wird, wird daher von der Lehre der vorliegenden Anmeldung Gebrauch gemacht.

Tabelle 3:

	PCT [ng/ml]	Pro-ANF [pg/tube]	Pro-ADM [pg/tube]	Pro-END [pg/tube]	Pro-BNP [pg/tube]
<u>Normalpatienten:</u>					
A	0,07	69,4	64	29,3	31,1
B	0,26	26,6	50,2	15,4	30,1
C	0,10	14,7	1,0	1,0	24,7
D	0,06	53,2	77,8	19,3	27,4
E	0,06	51,1	66,5	20,6	25,4
F	0,04	95,5	53,5	28,2	28,9
G	0,07	117	83,5	18,3	17,3
H	0,10	88,1	52,3	25,1	28,1
I	0,10	69,4	107	23,2	25
J	0,07	38,3	91,1	26,1	25,7
K	0,06	111	64,9	22,8	29,6
L	0,09	73,8	66,3	32,4	21,6
M	0,07	42	58,9	27,1	23,7
N	0,09	107	114	27,3	31,2
O	0,10	56,7	62,5	20,3	26,2
P	0,10	47,2	51,7	24,5	33,3
Q	0,12	155	72,5	34,6	36,7
R	0,13	92,1	64,7	29,6	35,2
S	0,12	153	100	34,7	36
T	0,11	78	69,6	27,1	37,7
<u>Sepsispatienten:</u>					
13a	1,1	333	195	70	34,9
10a	11,9	62,5	154	30,5	30,4
18b	6,4	323	209	75,4	46,4
19b	21,2	346	180	71,6	50,7
8a	1,8	303	203	70,3	48,8
9a	24,7	271	205	78,4	33,6
9b	29,0	305	210	62,5	40,3
12b	5,8	324	204	67,4	36,1
10b	1,9	127	128	30,5	33,9
16a	86,7	347	198	83,3	39
8b	1,1	138	153	29,6	33,7
20a	1,4	167	176	41,3	30,9
20b	1,1	170	178	39	34,9
13b	0,8	295	186	45,3	36,9
19a	17,6	354	201	58,6	54,5
7b	2,5	356	199	78,6	
7a	2,9	345	197	148	
16b	40,0	343	197	88,1	43,9
12a	5,2	327	216	76,1	34,3
15b	1,9	420	215	82,5	52

Patentansprüche

1. Verfahren zur differentialdiagnostischen Früherkennung und Erkennung, zur Beurteilung des Schweregrads und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung von Sepsis und schweren Infektionen, insbesondere sepsisähnlichen systemischen Infektionen, dadurch gekennzeichnet, daß man in einer Probe einer biologischen Flüssigkeit eines Patienten den Gehalts mindestens eines Peptid-Prohormons, das nicht Procalcitonin ist, und/oder eines sich davon ableitenden Teilpeptids, das nicht das aus dem Peptid-Prohormon erhältliche eigentliche Hormon ist, bestimmt und aus der festgestellten Anwesenheit und/oder Menge des bestimmten Prohormons auf das Vorliegen einer Sepsis oder sepsisähnlichen systemischen Infektion, ihren Schweregrad und/oder den Erfolg einer therapeutischen Behandlung schließt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid-Prohormon ausgewählt ist aus pro-Gastrin-Releasing Peptid (proGRP), pro-Endothelin-1 (pro-END), pro-Brain-Natriuretic-Peptid (pro-BNP), pro-Atrial-Natriuretic-Peptid (Pro-ANP bzw. pro-ANF), pro-Leptin, pro-Neuropeptid-Y, pro-Somatostatin, pro-Neuropeptid-YY oder pro-Adrenomedullin (pro-ADM) .
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Bestimmung ein Teilpeptid erfaßt wird, das sich von dem bekannten vollständigen Prohormon-Peptid durch das Fehlen eines Dipeptids am Amino-Terminus unterscheidet, wie es von der Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (DP IV oder DAP IV oder CD26) vom Ende eines Peptids abspaltbar ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Dipeptid ein Xaa-Pro-Dipeptid ist, wobei Xaa für die

- 22 -

aminoterminale Aminosäure des vollständigen Prohormon-Peptids steht.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die Bestimmung als Immunoassay oder Präzipitationsassay durchführt und auf Sepsis oder sepsisähnliche schwere Infektionen schließt, wenn die Konzentration des bestimmten Peptid-Prohormons signifikant über den Werten liegt, die bei gesunden Normalpersonen beobachtet werden können.

6. Verfahren zur differentialdiagnostischen Früherkennung, zur Erkennung des Schweregrads und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung von Sepsis und sepsisähnlichen systemischen Infektionen, dadurch gekennzeichnet, daß man in einer serum- oder Plasmaprobe eines Patienten den Gehalt an Dipeptidyl-Peptidase IV (DP IV; Dipeptidyl-Aminopeptidase IV; DAP IV oder CD 26) bestimmt und aufgrund einer gegenüber gesunden Normalpersonen signifikant erniedrigten Konzentration das Vorliegen einer Sepsis oder sepsisähnlichen systemischen Infektion diagnostiziert.

7. Gentechnologisch hergestelltes Procalcitonin 3-116.

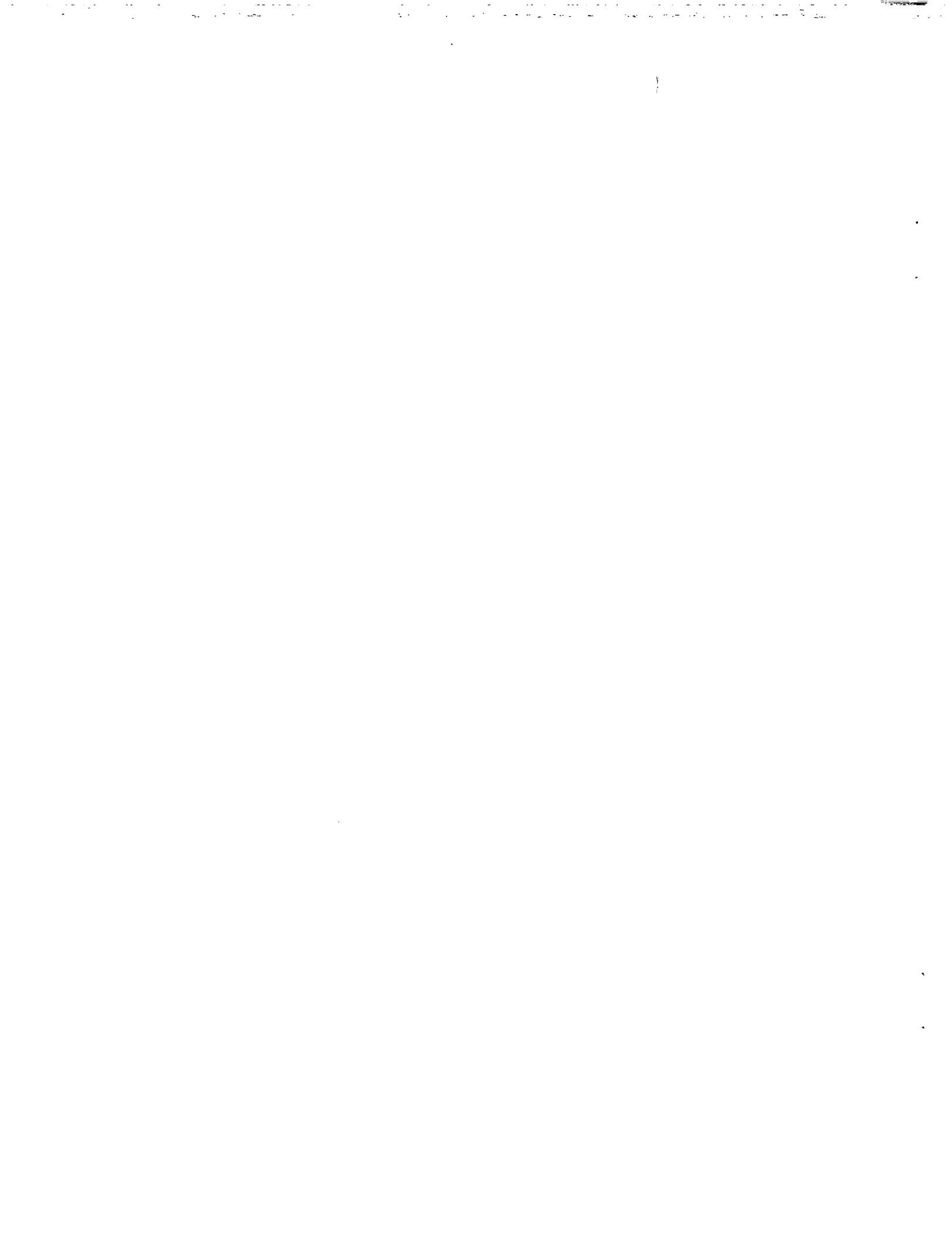
8. Verfahren zur gentechnologischen Herstellung von Procalcitonin 3-116, bei dem man eine für die 114 Aminosäuren des Procalcitonins 3-116 codierende cDNA-Sequenz in einen geeigneten Vektor inseriert, mit dem gebildeten Vektor geeignete Wirtszellen transformiert, so daß diese Procalcitonin 3-116 exprimieren, daß man die Wirtszellen aufarbeitet und eine das exprimierte Procalcitonin 3-116 enthaltende Fraktion isoliert und daraus durch chromatographische Reingung das gentechnologisch hergestellte Procalcitonin 3-116 in wenigstens 90%iger Reinheit gewinnt.

9. Verwendung von rekombinant hergestelltem Procalcitonin 3-116 als Kalibrator in Procalcitonin-Assays oder zur Her-

- 23 -

stellung von Therapeutika zur Vorbeugung und Behandlung von Sepsis und sepsisähnlichen systemischen Infektionen.

10. Verfahren zur Messung von Procalcitonin 3-116 als indikationsunabhängiger Diagnostikparameter.



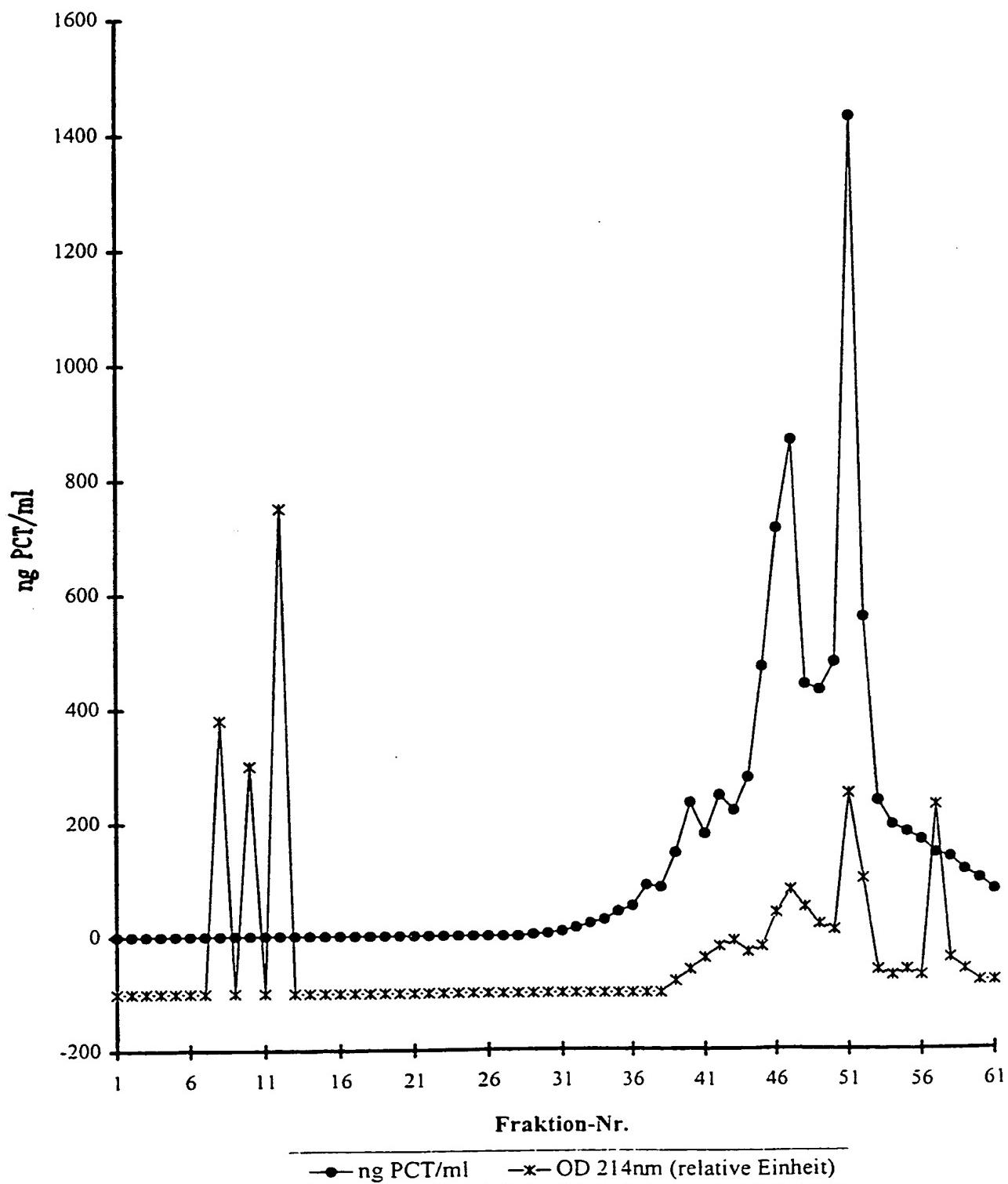
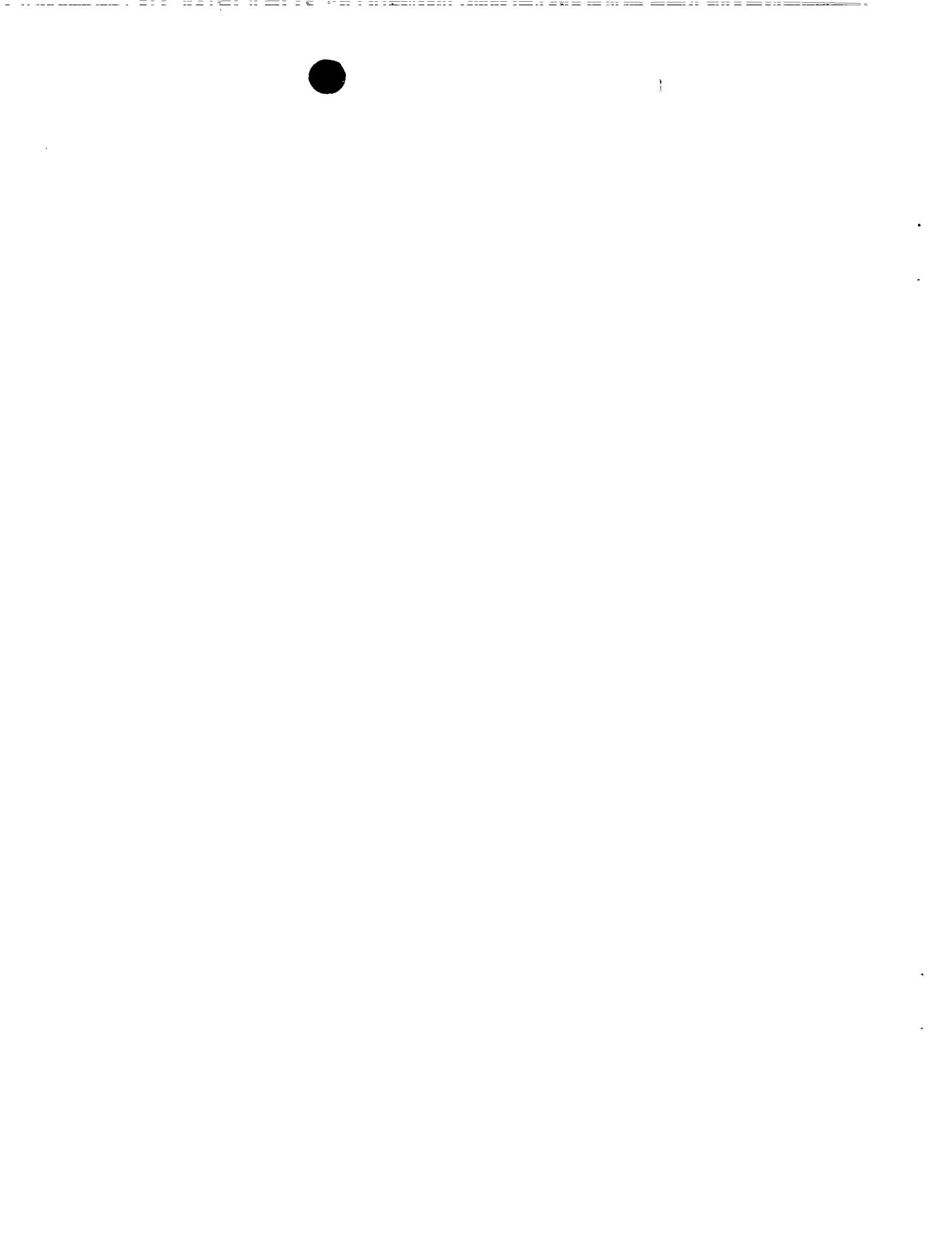
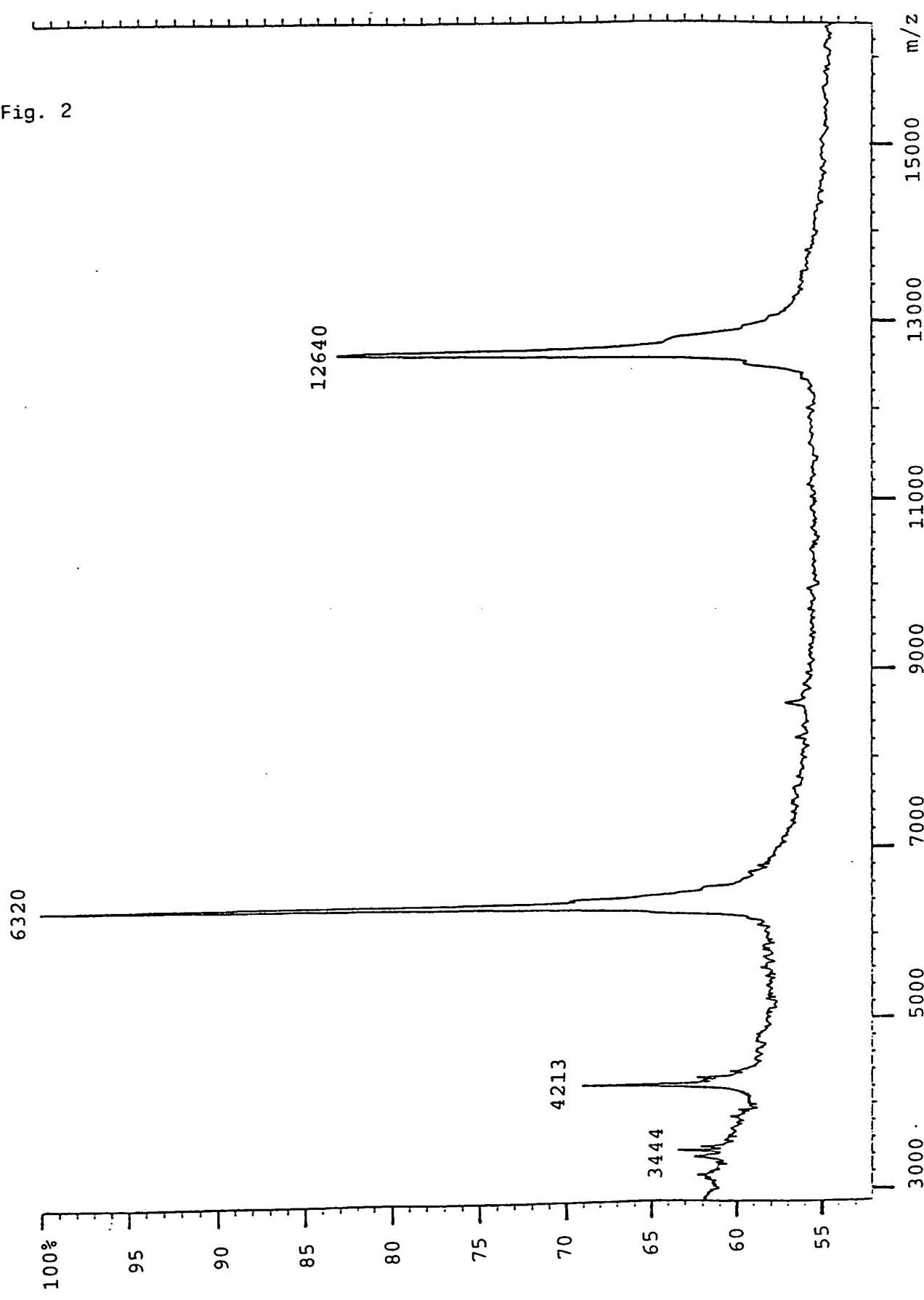
HPLC-Reinigung von affinitätsgereinigtem humanen PCT

Fig. 1





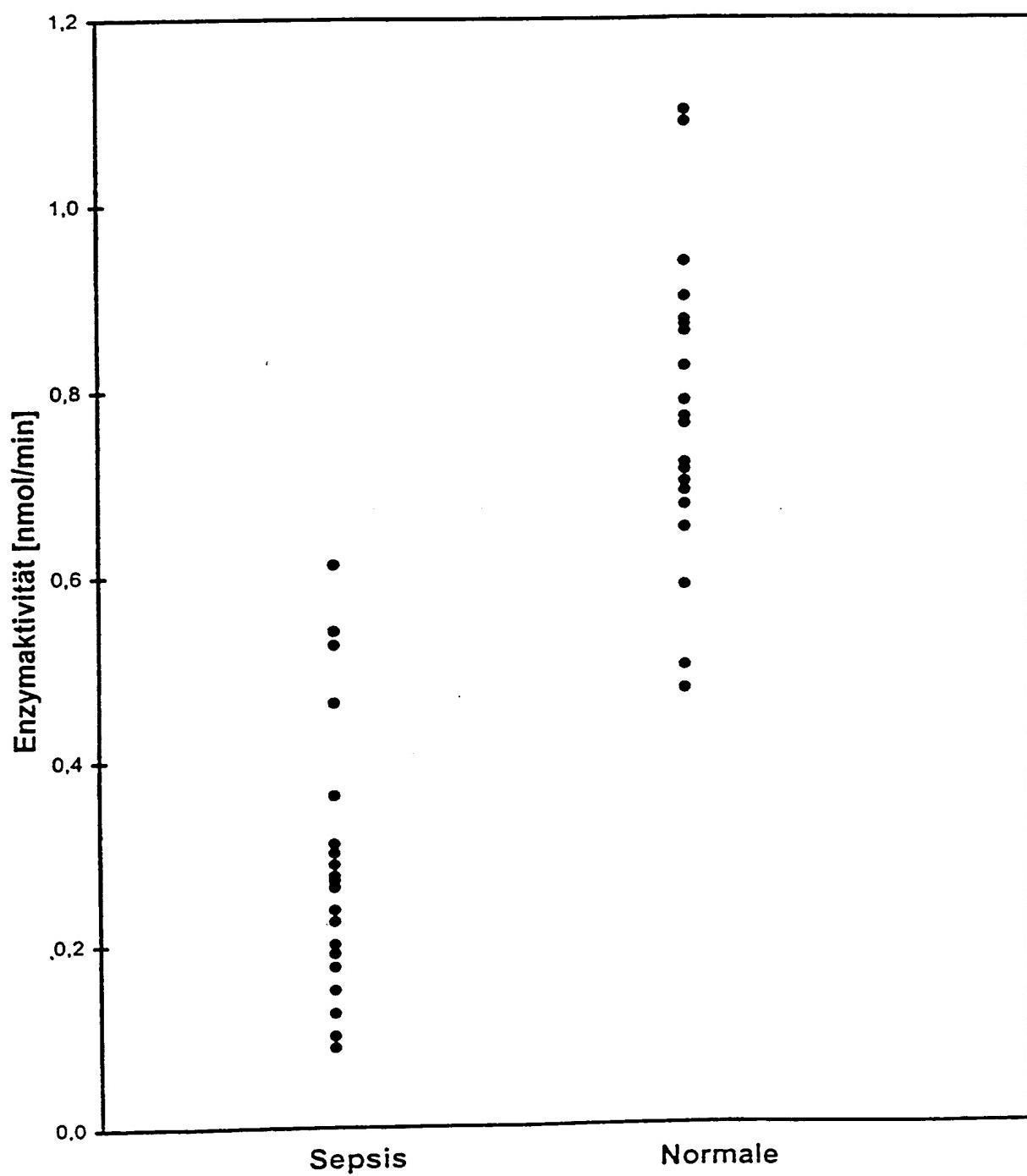
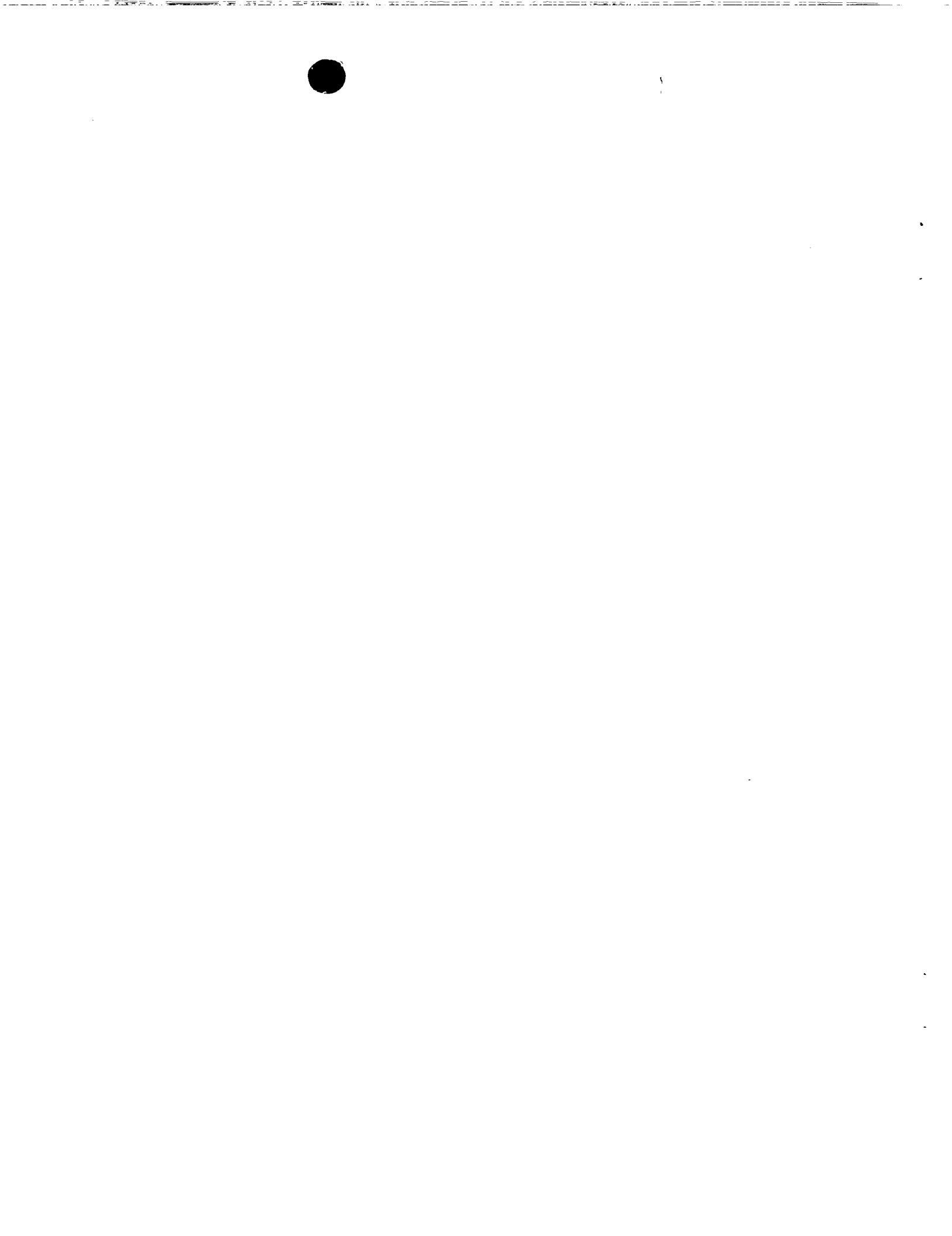
Enzymaktivität von DAP IV in septischen Seren vs. Blutspenderseren

Fig. 3:



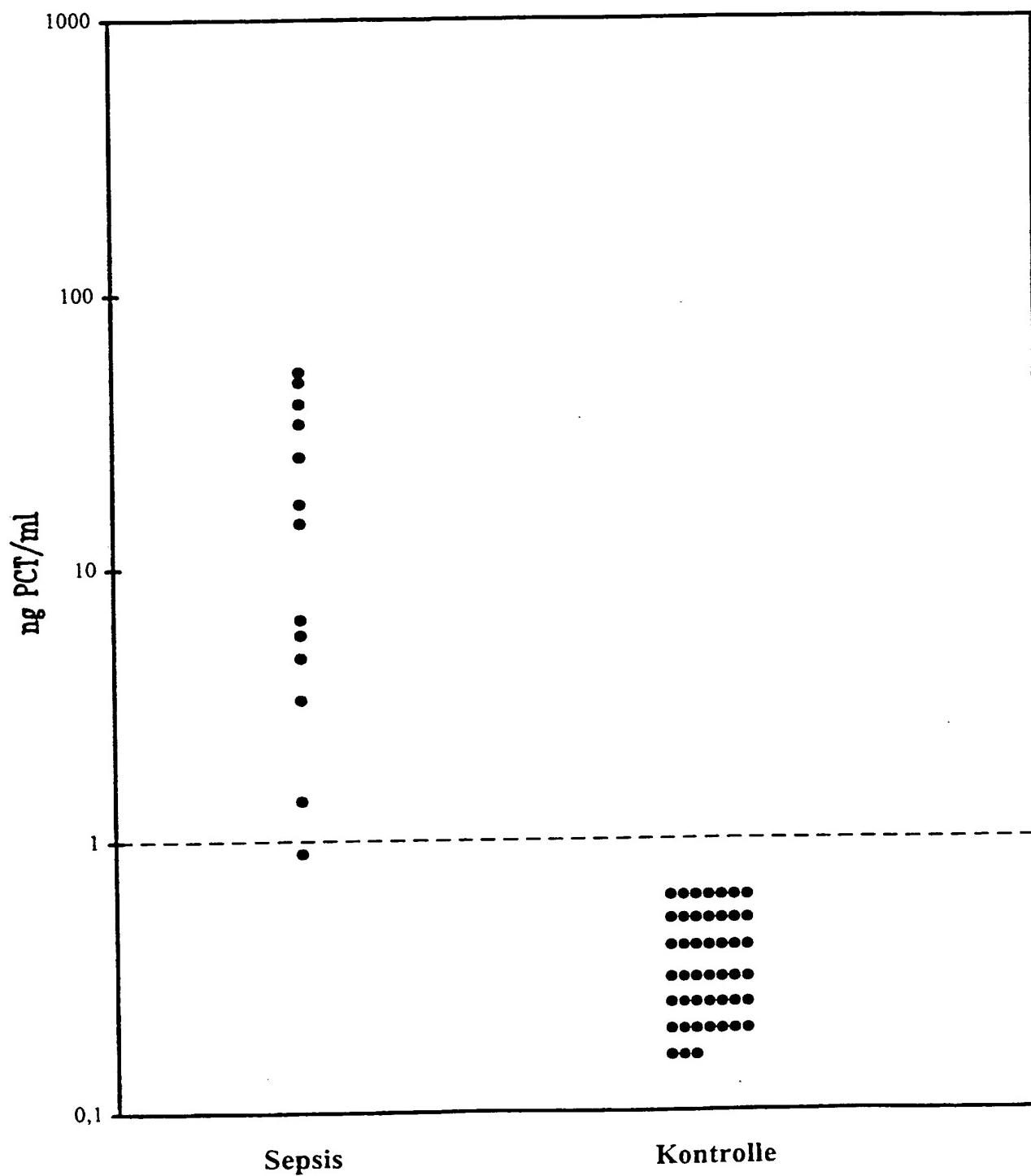
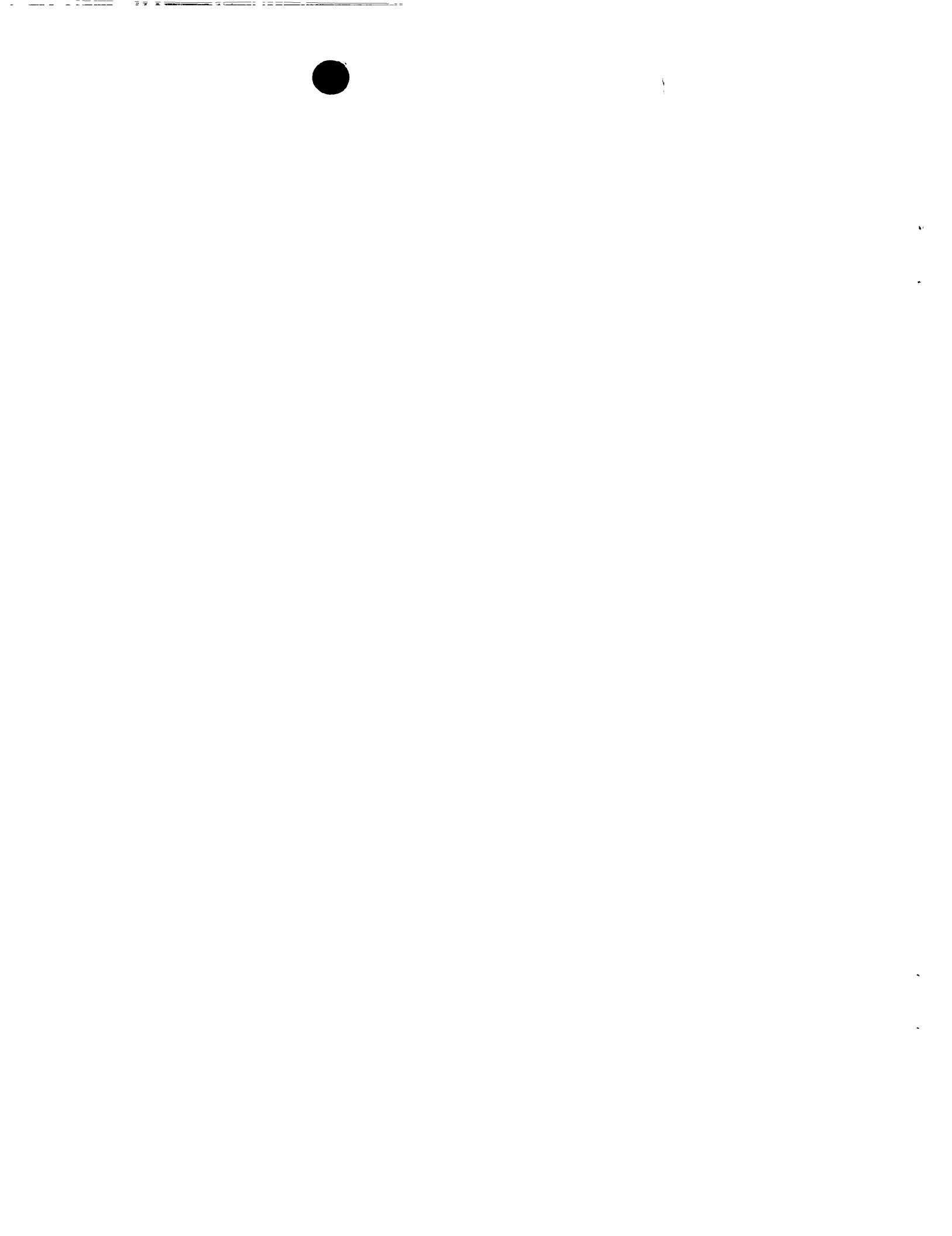
Procalcitonin

Fig. 4a



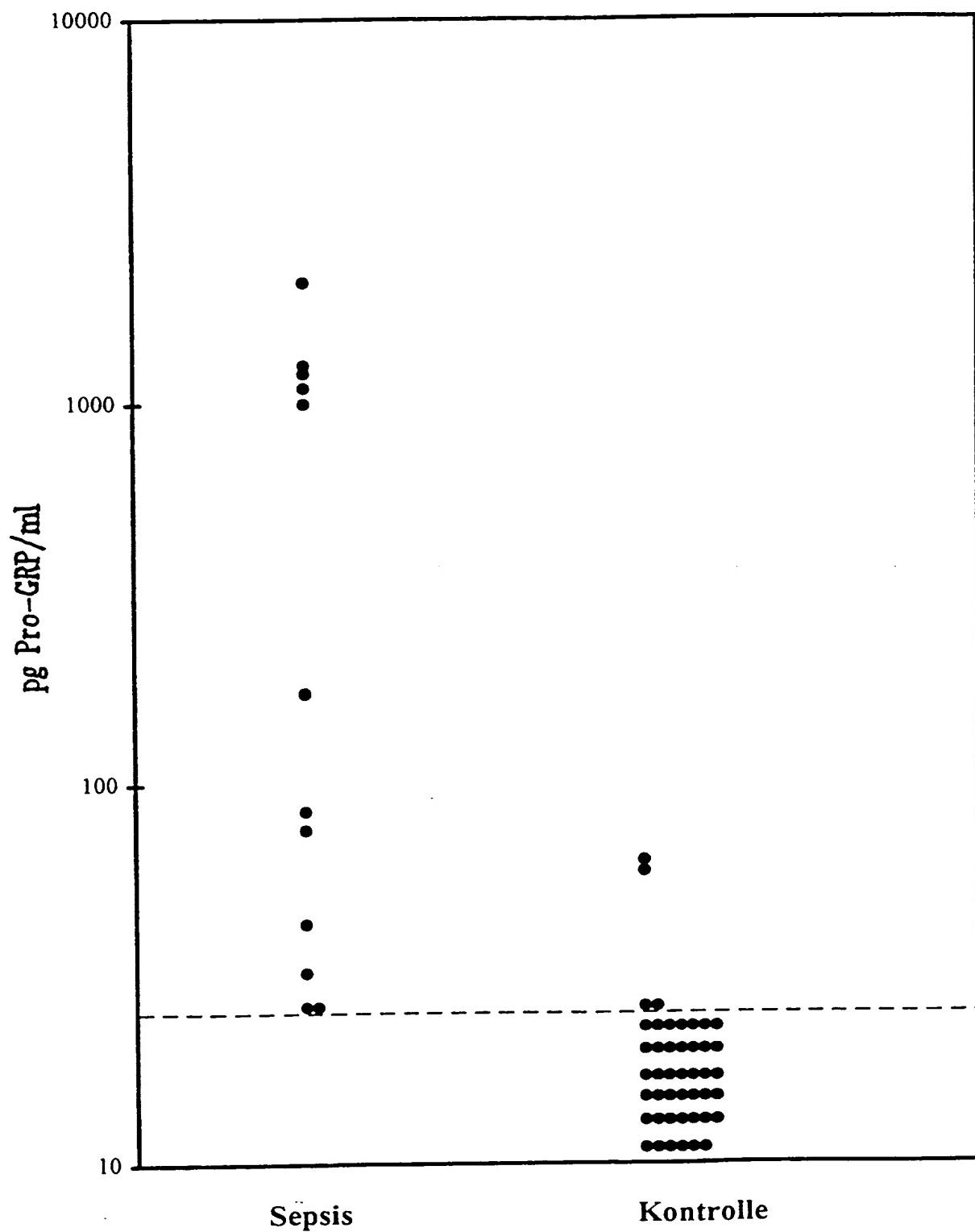
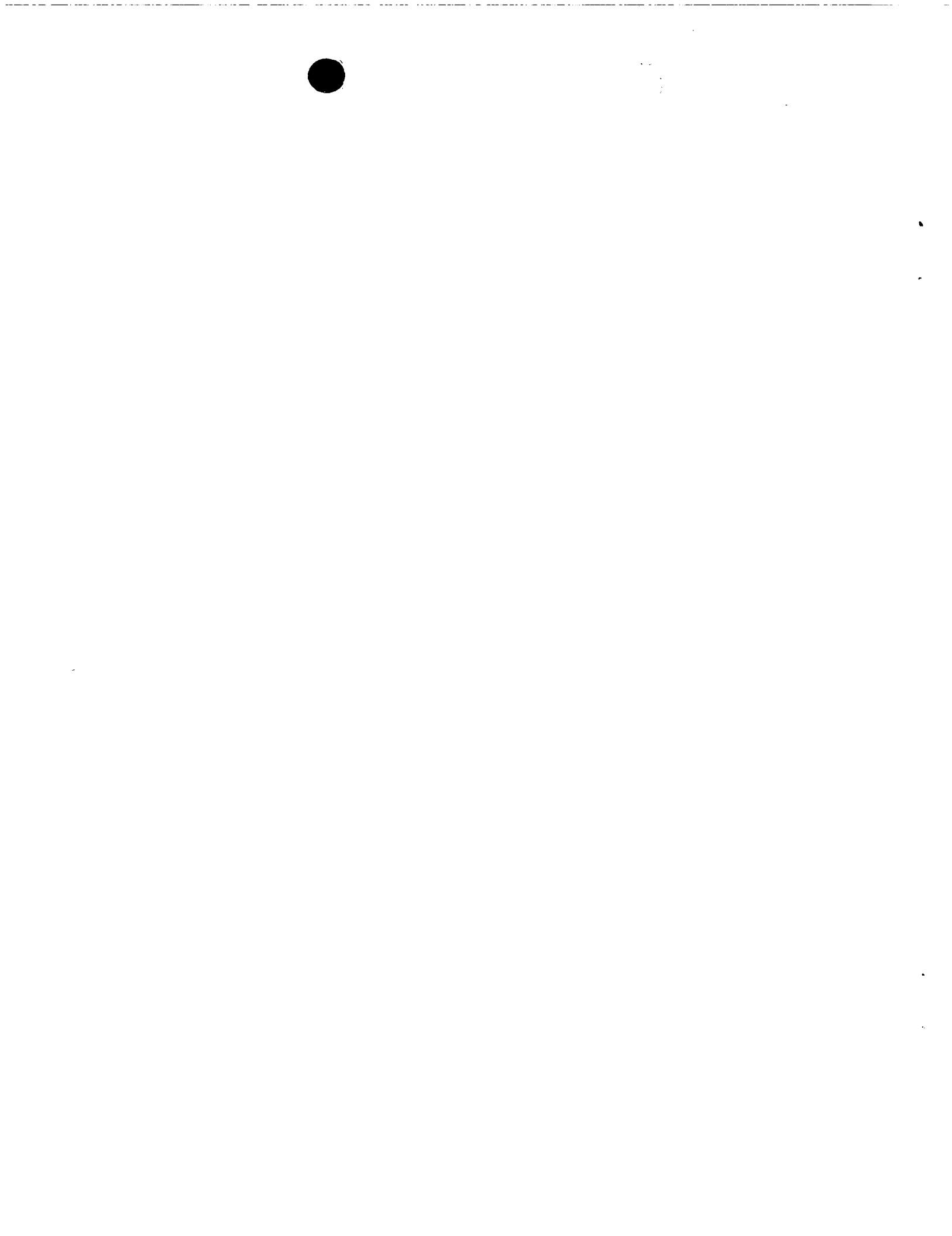
Pro-GRP

Fig. 4b



Vergleich der Procalcitonin-Konzentration von
Normalpatienten vs. Sepsispatienten

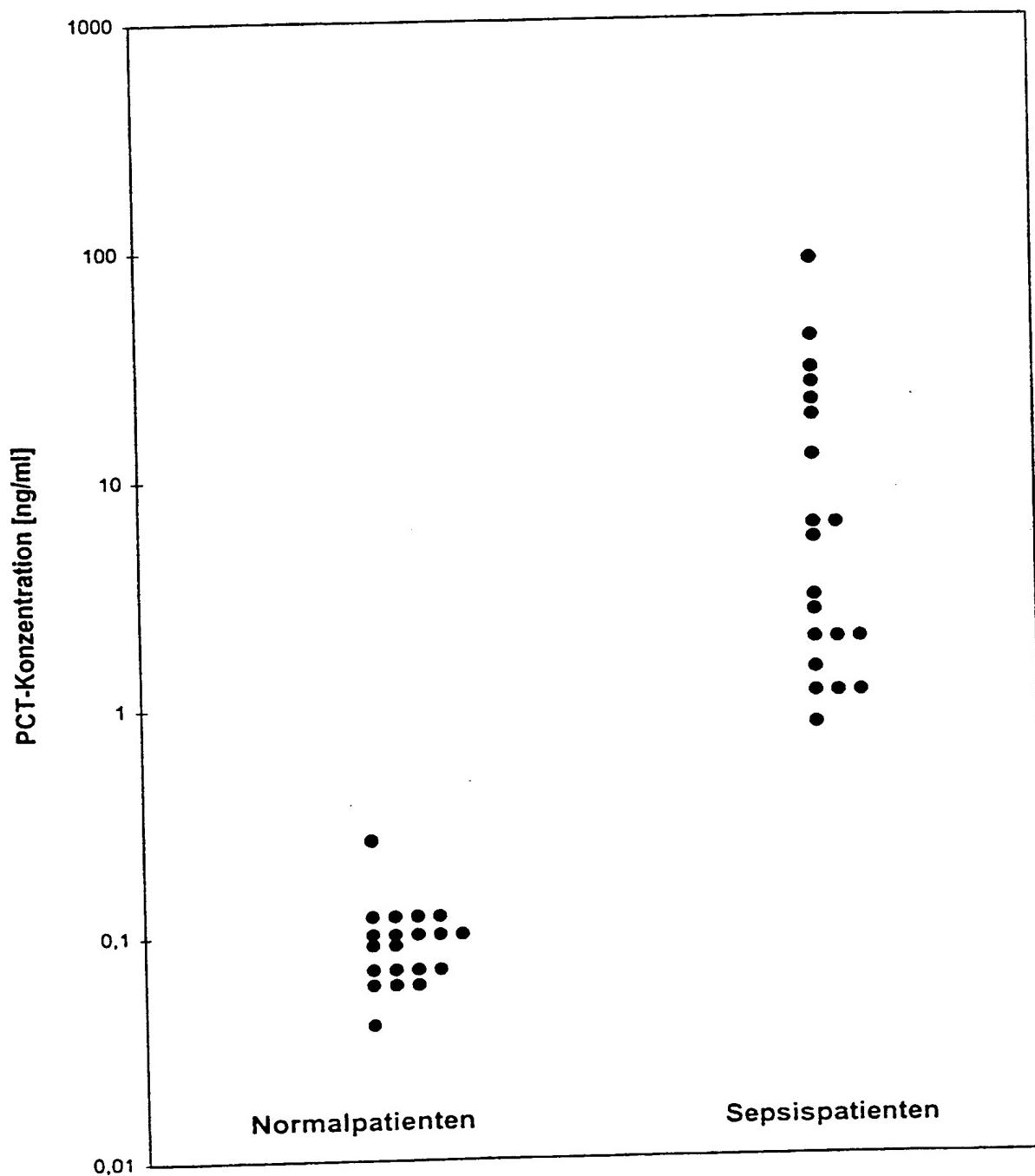
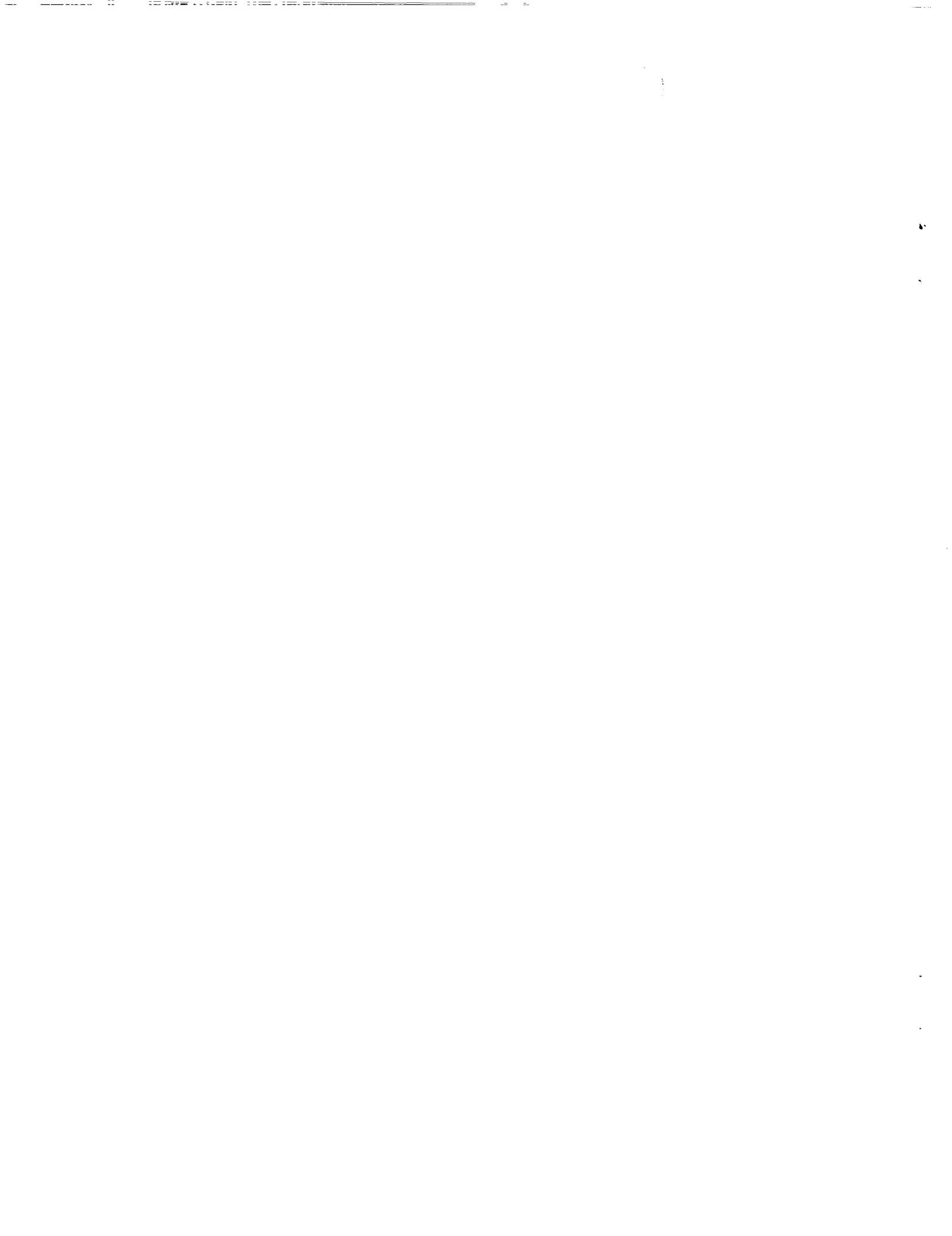


Fig. 5



7/10

**Vergleich der Prepro-ANF (26-55)-Konzentration von
Normalpatienten vs. Sepsispatienten**

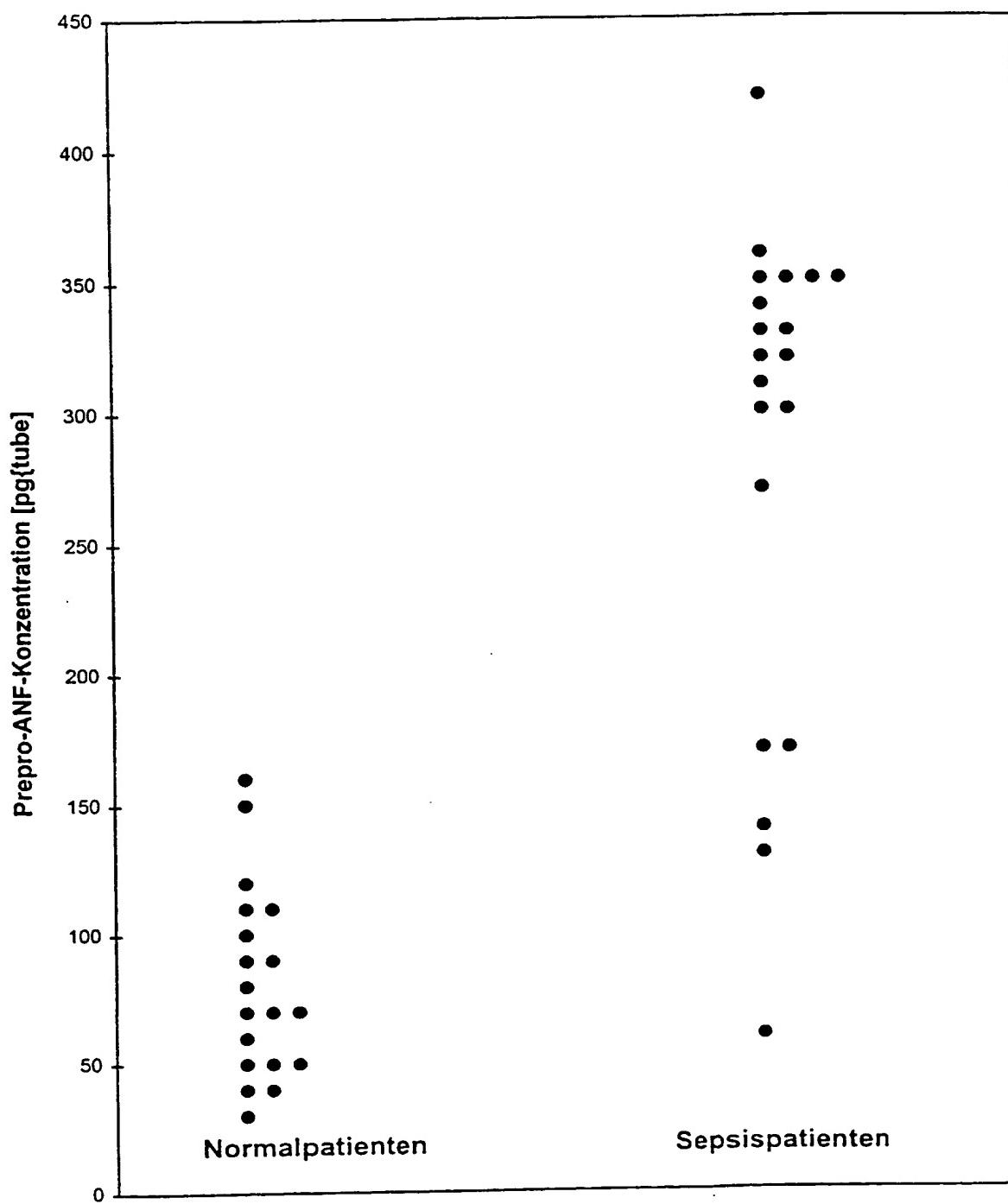
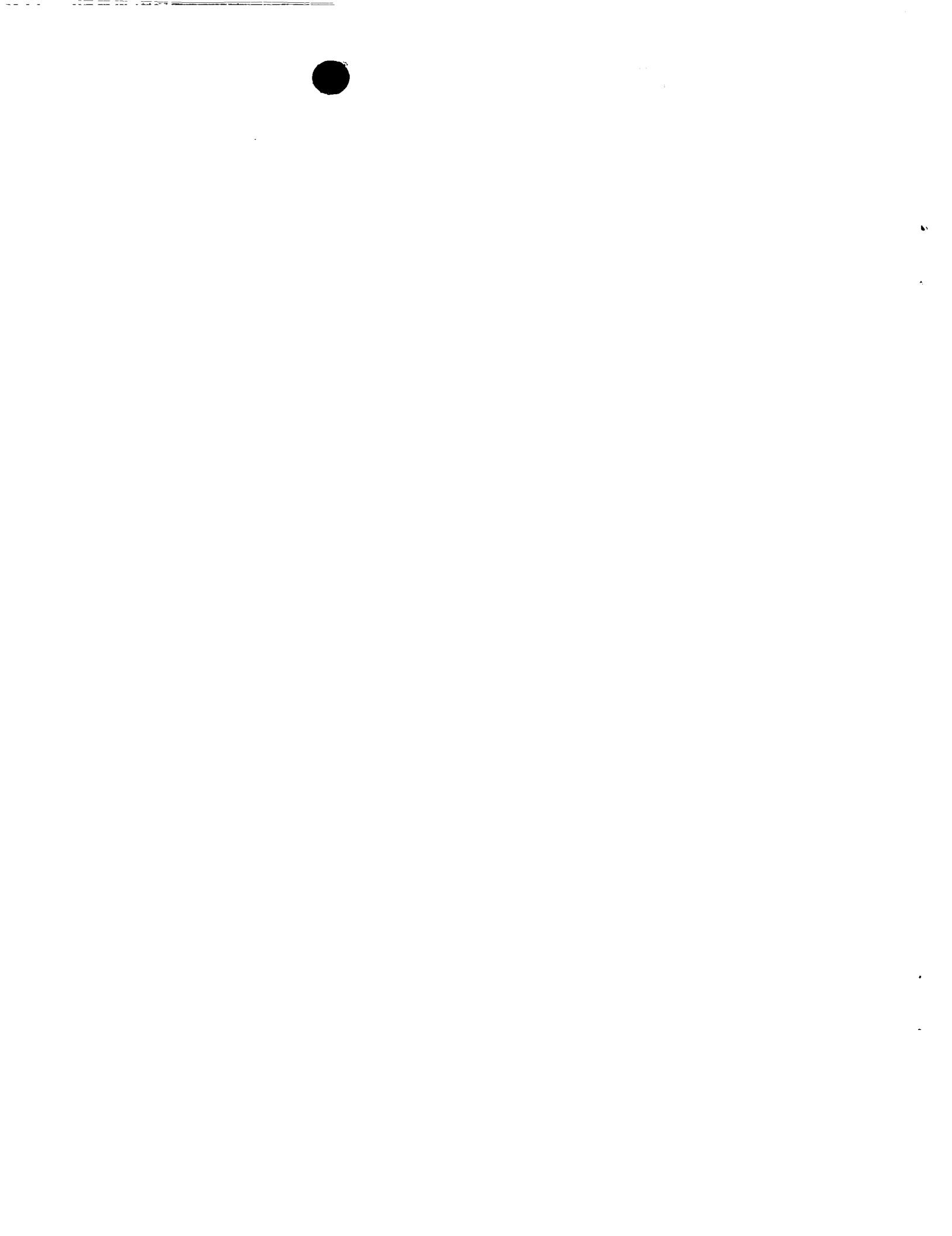


Fig. 6



Vergleich der Pro-Adrenomedullin (45-92)-Konzentration von Normalpatienten vs. Sepsispatienten

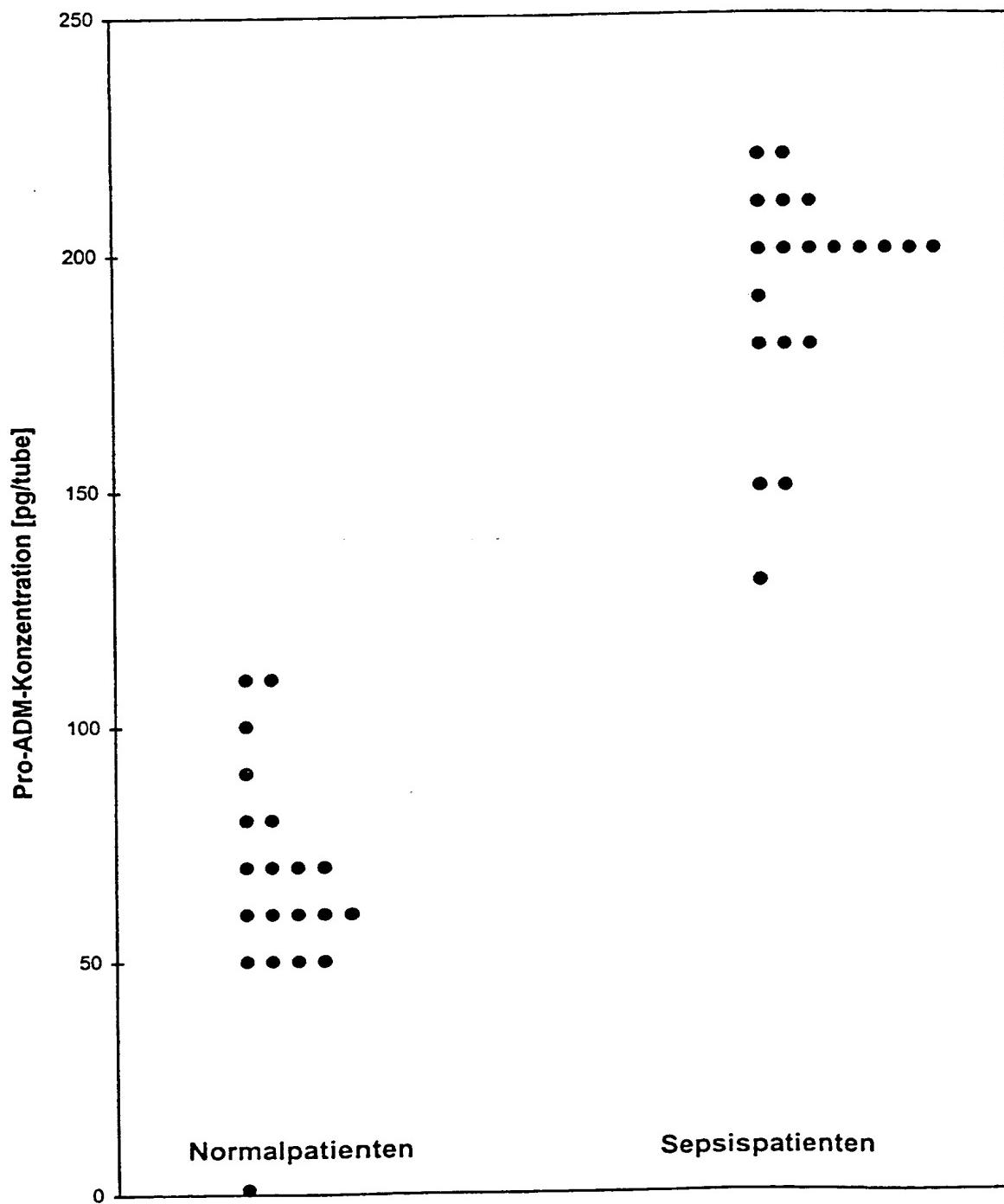
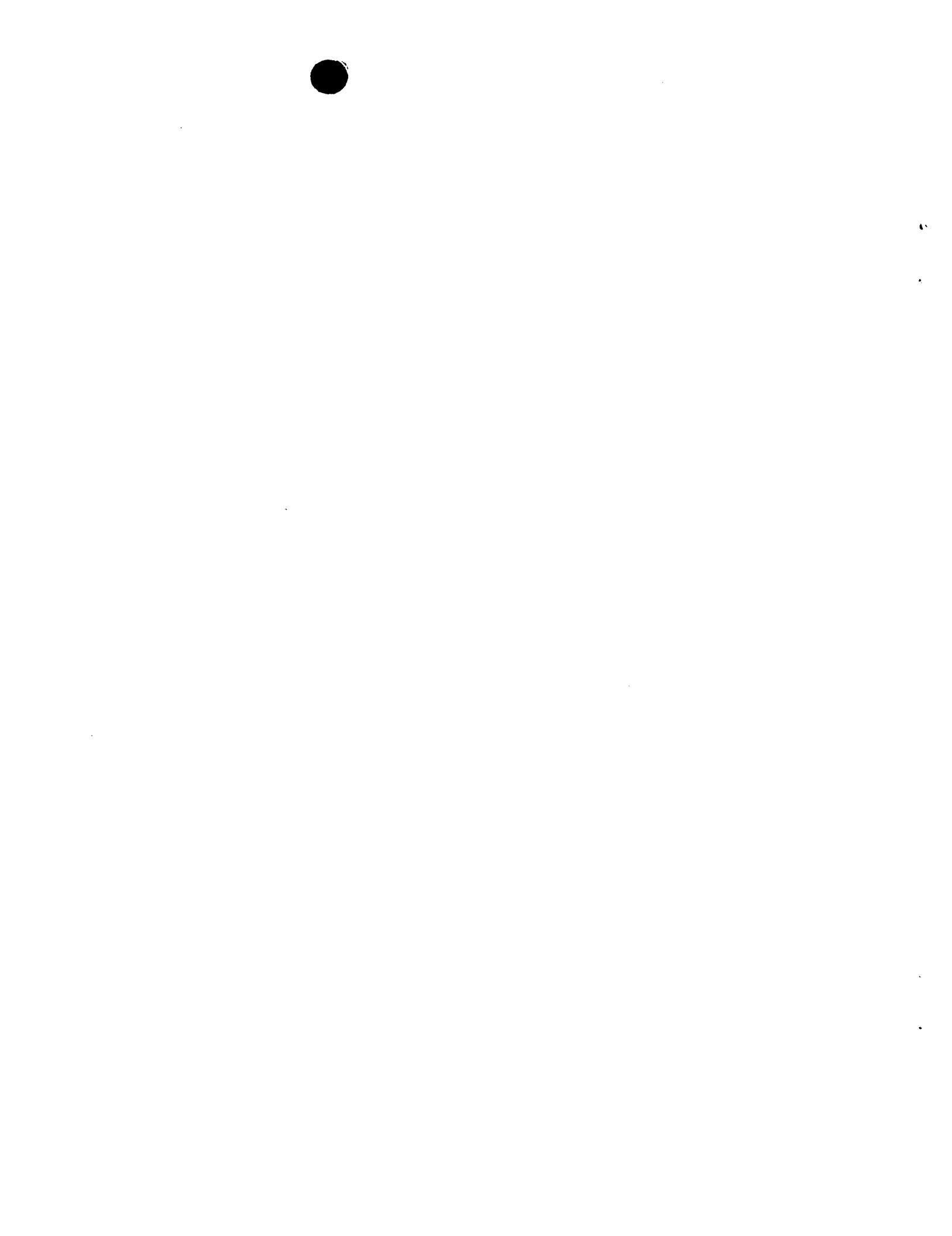


Fig. 7



**Vergleich der Prepro-Endothelin (18-50)-Konzentration von
Normalpatienten vs. Sepsispatienten**

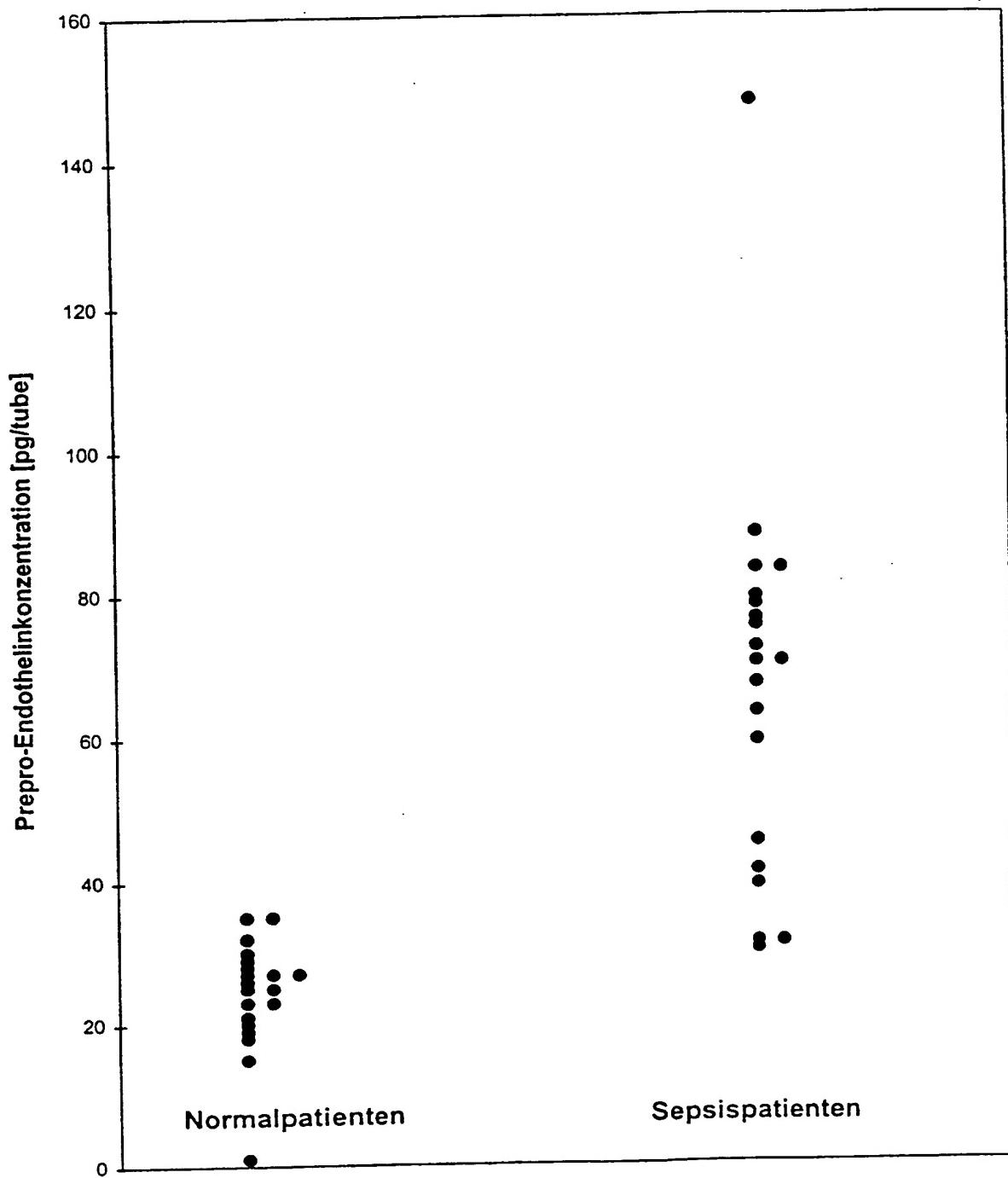
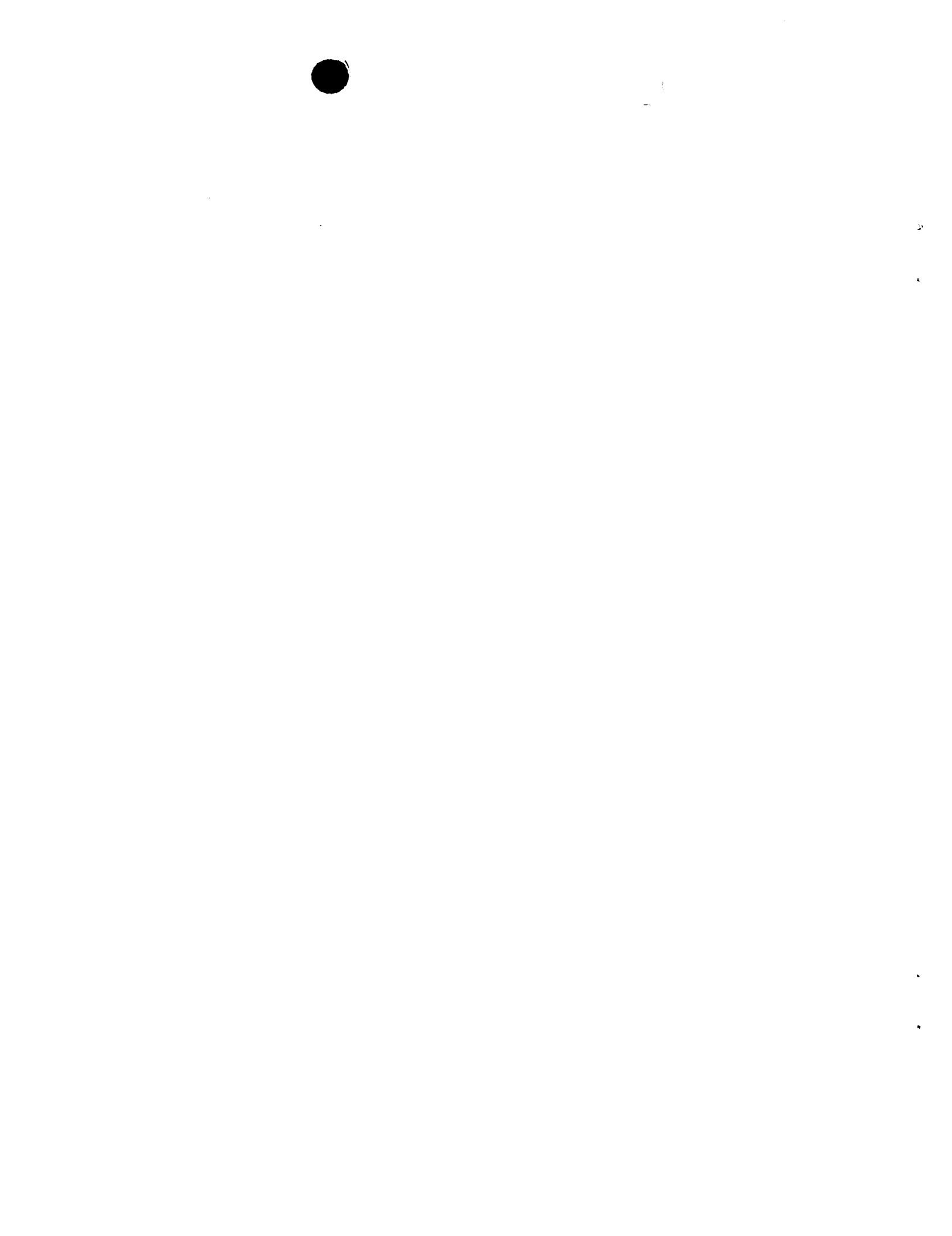


Fig. 8



Vergleich der Prepro-BNP (22-46)-Konzentration von
Normalpatienten vs. Sepsispatienten

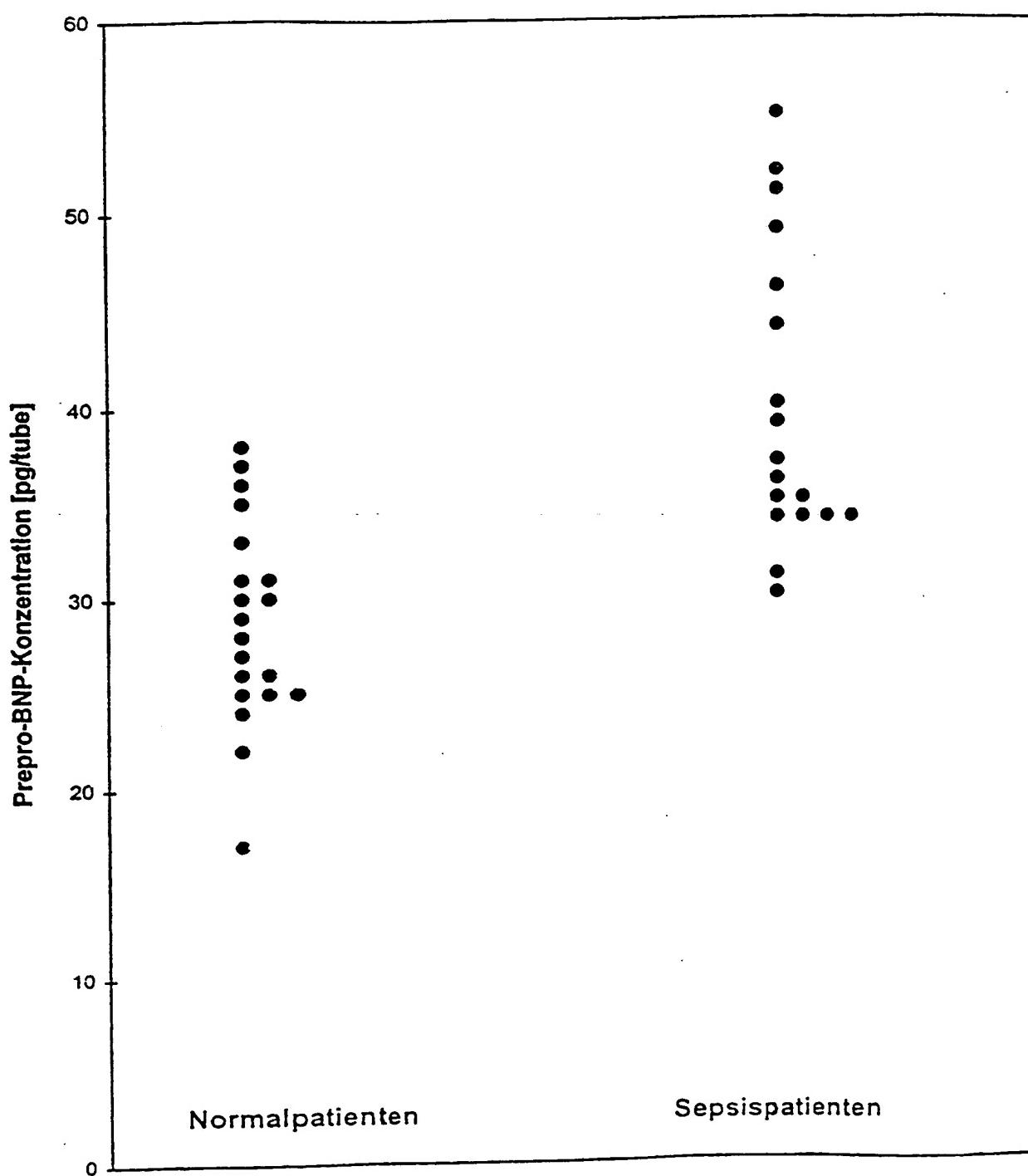
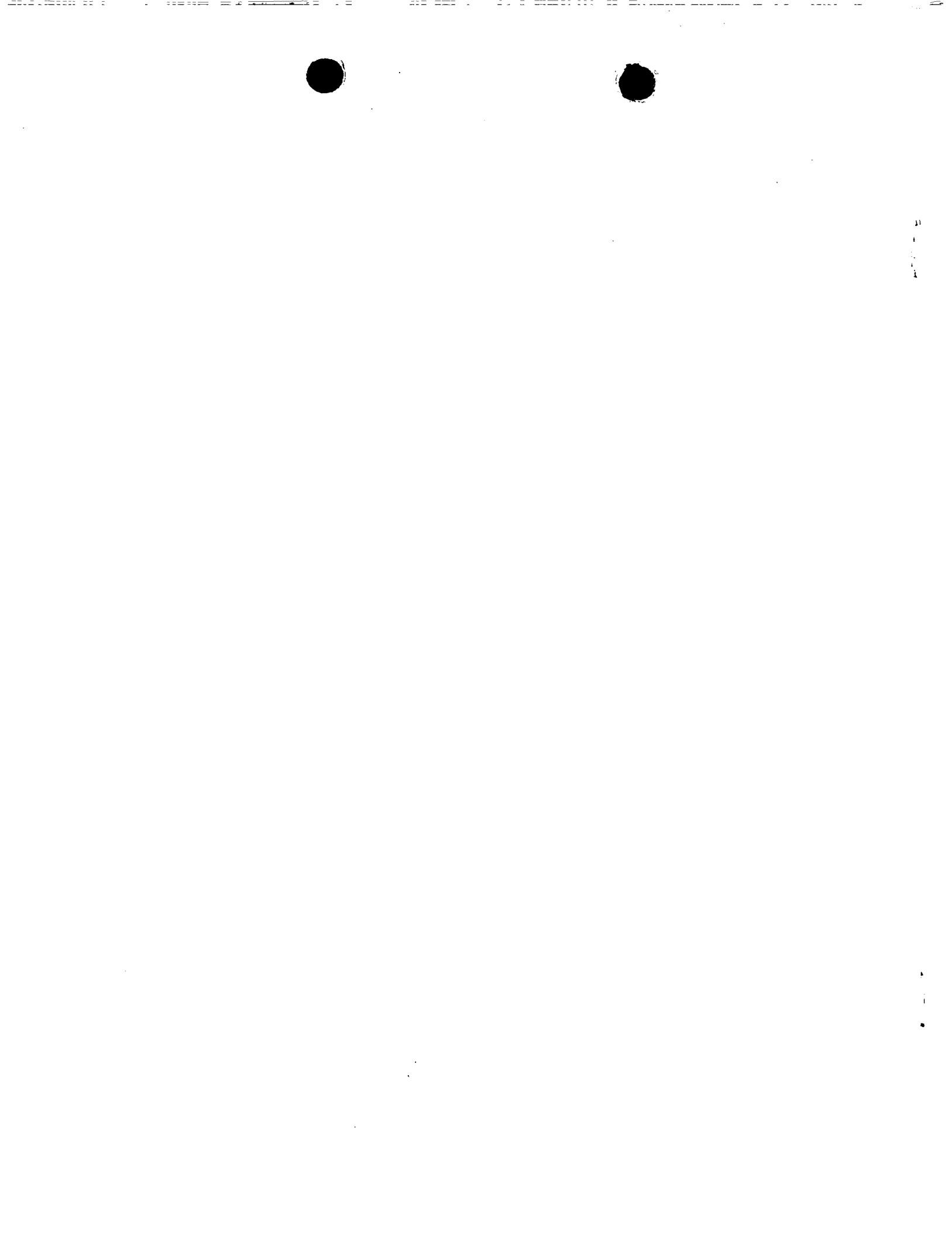


Fig. 9

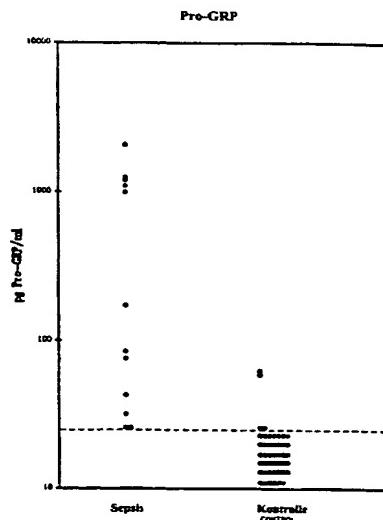
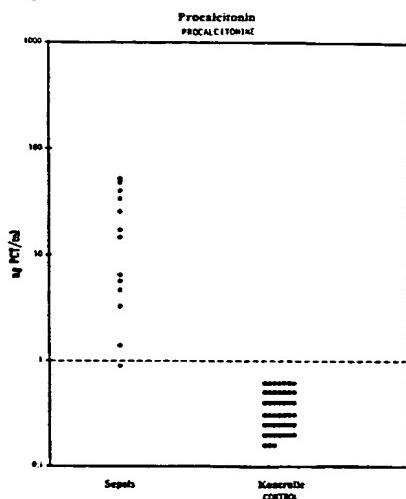


PCTWELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/74, C07K 14/585, A61K 38/23, 38/22	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/22439 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07692		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 13. Oktober 1999 (13.10.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 47 690.6 15. Oktober 1998 (15.10.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): B.R.A.H.M.S DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Komturstrasse 19-20, D-12099 Berlin (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 16. November 2000 (16.11.00)
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): BERGMANN, Andreas [DE/DE]; Baumläuferweg 47, D-12351 Berlin (DE). STRUCK, Joachim [DE/DE]; Holsteinische Strasse 28, D-12161 Berlin (DE). WEGLÖHNER, Wolfgang [DE/DE]; Lorenzweg 2, D-12099 Berlin (DE).		
(74) Anwälte: ANDRAE, Steffen; Andrae Flach Haug, Balanstrasse 55, D-81541 München (DE) usw.		

(54) Title: METHOD AND SUBSTANCES FOR DIAGNOSIS AND THERAPY OF SEPSIS AND SEPSIS-LIKE SYSTEMIC INFECTIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND SUBSTANZEN FÜR DIE DIAGNOSE UND THERAPIE VON SEPSIS UND SEPSISÄHNLICHEN SYSTEMISCHEN INFektIONEN

**(57) Abstract**

The invention relates to applications of recombinant procalcitonin 3–116 for the diagnosis and therapy of septic diseases and to the measurement of prohormones different from procalcitonin and dipeptidyl peptidase IV as biomarker in the diagnosis of sepsis.

(57) Zusammenfassung

Verwendungen von rekombinantem Procalcitonin 3–116 im Rahmen der Diagnose und Therapie von septischen Erkrankungen sowie die Messung von anderen Prohormonen als Procalcitonin sowie von Dipeptidyl Peptidase IV als Biomarker im Rahmen der Sepsisdiagnose.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/07692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/74 C07K14/585 A61K38/23 A61K38/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OKAHARA S ET AL: "SERUM PRO-GASTRIN-RELEASING PEPTIDE (PROGRP) IN SUBJECTS WITH OR WITHOUT HERICOBACTER PYLORI INFECTION" GASTROENTEROLOGY, US, ELSEVIER, NEW YORK, NY,, vol. 110, no. 4, April 1996 (1996-04), page A217 XP000884904 ISSN: 0016-5085 abstract ---- -/-	1,2,5

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 September 2000

Date of mailing of the international search report

18.09.2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 99/07692

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NORIHARU SHIJUBO ET AL: "ELEVATED PROGASTRIN-RELEASING PEPTIDE (31-98) CONCENTRATIONS IN PLEURAL EFFUSIONS DUE TO SMALL-CELL LUNG CARCINOMA" RESPIRATION, CH, KARGER, BASEL, vol. 63, no. 2, 1 March 1996 (1996-03-01), pages 106-110, XP000608937 ISSN: 0025-7931 page 107, column 1, paragraphs 2,4 page 107, column 2, paragraph 4; figure 1 page 109, column 2, paragraphs 2,3 ---	1,2,5
X	MIYAKE, Y. ET AL.: "Pro-Gastrin-Releasing Peptide(31-98) Is a Specific Tumor Marker in Patients with Small Cell Lung Carcinoma" CANCER RESEARCH, vol. 54, 15 April 1994 (1994-04-15), pages 2136-2140, XP002132024 page 2137, column 1, line 1 - line 7; figure 2 ---	1,2,5
X	GUO Y ET AL: "PRODUCTION OF ENDOTHELINS BY THE VENTILATORY MUSCLES IN SEPTIC SHOCK" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, US, AMERICAN LUNG ASSOCIATION, NEW YORK, NY, vol. 1, no. 3, September 1998 (1998-09), pages 470-476, XP000879419 ISSN: 1044-1549 page 472, column 2, paragraph 3 ---	1,2,5
A	MCLOUGHLIN L ET AL: "CHARACTERIZATION OF CIRCULATING PRO-OPIOMELANOCORTIN-RELATED PEPTIDES IN HUMAN SEPTIC SHOCK" JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, GB, BRISTOL, vol. 119, no. 1, October 1988 (1988-10), pages 159-165, XP000879345 ISSN: 0022-0795 cited in the application abstract page 161, column 1, paragraph 2 ---	1,2,5
A	NYLEN E S ET AL: "PNEUMONITIS-ASSOCIATED HYPERPROCALCITONINEMIA" AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES, XX, XX, vol. 312, no. 1, July 1996 (1996-07), pages 12-18, XP000879269 ISSN: 0002-9629 page 15, column 1, line 2 - line 5 page 15, column 2, line 5 - line 9 ---	1-10 -/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/07692

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ASSICOT M ET AL: "HIGH SERUM PROCALCITONIN CONCENTRATIONS IN PATIENTS WITH SEPSIS AND INFECTION" LANCET THE, GB, LANCET LIMITED. LONDON, vol. 341, no. 8844, 27 February 1993 (1993-02-27), pages 515-518, XP000371780 ISSN: 0140-6736 abstract ---	1-10
A	KARZAI W ET AL: "PROCALCITONIN - A NEW INDICATOR OF THE SYSTEMIC RESPONSE TO SEVERE INFECTIONS" INFECTION, DE, MMV MEDIZIN VERLAG, MUENCHEN, vol. 25, no. 6, November 1997 (1997-11), pages 329-334, XP000879253 ISSN: 0300-8126 page 329, column 2, paragraph 2 ---	1-10
A	DE 42 27 454 C (HENNING BERLIN GMBH) 3 February 1994 (1994-02-03) cited in the application claim 1 ---	1-10
A	QURESHI, N.U. ET AL.: "Endogenous neuropeptide Y mediates vasoconstriction during endotoxic and hemorrhagic shock" REGULATORY PEPTIDES, vol. 75-76, 25 September 1998 (1998-09-25), pages 215-220, XP000925467 abstract page 215, column 1 -column 2, line 3 page 219, column 1, paragraph 3 ---	1-6
A	NORLANDER, T. ET AL.: "Effects of experimental Mycoplasma pulmonis infection on sensory neuropeptides and airway mucosa in the rat" EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, vol. 10, 1997, pages 2334-2342, XP000925422 abstract page 2341, column 1, paragraph 2 ---	1-6
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/07692

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KÜLLERTZ, G.: "Die Bedeutung der Aktivitätsbestimmung des Enzyms Dipeptidyl-Peptidase IV (DP IV) im klinischen Laboratorium" LAB.MED., vol. 12, 1988, pages 123-130, XP000933866 page 123, column 2 -page 124, column 1, paragraph 1 page 125, column 1, paragraph 2 - paragraph 3; table 4 page 128, column 1, paragraph 2 page 129, column 1, paragraph 4 - paragraph 5 ---	6
A	VANHAM, G. ET AL.: "Decreased Expression of the Memory Marker CD26 on Both CD4+ and CD8+ T Lymphocytes of HIV-Infected Subjects" JOURNAL OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROMES, vol. 6, no. 7, July 1993 (1993-07), pages 749-757, XP000925435 page 751, column 1, paragraph 6 page 753, column 2, paragraph 3 page 756, column 1, paragraph 2 ---	6
A	YARON, A. AND NAIDER, F.: "Proline-Dependent Structural and Biological Properties of Peptides and Proteins" CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 28, 1993, pages 31-81, XP000925565 page 55, column 1, line 15 -column 2 page 56, column 2, paragraph 2 -page 57, column 1, line 3 ---	1-6
A	ORAVECZ T ET AL: "REGULATION OF THE RECEPTOR SPECIFICITY AND FUNCTION OF THE CHEMOKINE RANTES (REGULATED ON ACTIVATION, NORMAL T CELL EXPRESSED AND SECRETED) BY DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV (CD26)-MEDIATED CLEAVAGE" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 186, no. 11, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 1865-1872, XP002056059 ISSN: 0022-1007 cited in the application the whole document ---	1-6
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 99/07692

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	P PROOST ET AL: "Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/Dipeptidyl-peptidase IV" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 273, no. 13, 27 March 1998 (1998-03-27), pages 7222-7227-7227, XP002102982 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document ---	1-6
T	WRENGER, S. ET AL: "Amino-terminal truncation of procalcitonin, a marker for systemic bacterial infections, by dipeptidyl peptidase IV (DP IV)." FEBS LETTERS, (JAN. 21, 2000) VOL. 466, NO. 1, PP. 155-159., XP002143500 the whole document -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

P/EP99/07692

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Sheet

Based on the results of the preliminary examination under PCT Rule 40.2 (e), part of the additional fees is to be reimbursed.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

ADDITIONAL MATTER

PCT/ISA/210

The International Searching Authority has found that this international application contains several (groups of) invention as follows:

1. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using proGRP

2. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-END

3. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-BNP

4. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-ANP

5. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-leptin

6. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-neuropeptide

7. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-somatostatin

8. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-ADM

9. Claims: 1-10

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using a partial peptide of a prohormone modified by dipeptidyl aminopeptidase IV.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07692

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 4227454	C	03-02-1994	AT 163767 T	15-03-1998
			AU 686114 B	05-02-1998
			AU 4951193 A	15-03-1994
			BR 9306928 A	03-12-1996
			CA 2142599 A	03-03-1994
			CN 1090928 A, B	17-08-1994
			DE 69317289 D	09-04-1998
			DE 69317289 T	08-10-1998
			WO 9404927 A	03-03-1994
			EP 0656121 A	07-06-1995
			ES 2114065 T	16-05-1998
			JP 8501151 T	06-02-1996
			MX 9305028 A	31-05-1994
			NO 950594 A	05-04-1995
			RU 2137130 C	10-09-1999
			SI 9300433 A	31-03-1994
			US 5639617 A	17-06-1997
			ZA 9306042 A	21-02-1994

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07692

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N33/74 C07K14/585 A61K38/23 A61K38/22

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G01N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	OKAHARA S ET AL: "SERUM PRO-GASTRIN-RELEASING PEPTIDE (PROGRP) IN SUBJECTS WITH OR WITHOUT HERICOBACTER PYLORI INFECTION" GASTROENTEROLOGY, US, ELSEVIER, NEW YORK, NY,, Bd. 110, Nr. 4, April 1996 (1996-04), Seite A217 XP000884904 ISSN: 0016-5085 Zusammenfassung ---- -/-	1,2,5

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. September 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. 09. 2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

INTERNATIONALER **UCHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07692

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NORIHARU SHIJUBO ET AL: "ELEVATED PROGASTRIN-RELEASING PEPTIDE (31-98) CONCENTRATIONS IN PLEURAL EFFUSIONS DUE TO SMALL-CELL LUNG CARCINOMA" RESPIRATION, CH, KARGER, BASEL, Bd. 63, Nr. 2, 1. März 1996 (1996-03-01), Seiten 106-110, XP000608937 ISSN: 0025-7931 Seite 107, Spalte 1, Absätze 2,4 Seite 107, Spalte 2, Absatz 4; Abbildung 1 Seite 109, Spalte 2, Absätze 2,3 ---	1,2,5
X	MIYAKE, Y. ET AL.: "Pro-Gastrin-Releasing Peptide(31-98) Is a Specific Tumor Marker in Patients with Small Cell Lung Carcinoma" CANCER RESEARCH, Bd. 54, 15. April 1994 (1994-04-15), Seiten 2136-2140, XP002132024 Seite 2137, Spalte 1, Zeile 1 - Zeile 7; Abbildung 2 ---	1,2,5
X	GUO Y ET AL: "PRODUCTION OF ENDOTHELINS BY THE VENTILATORY MUSCLES IN SPETIC SHOCK" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, US, AMERICAN LUNG ASSOCIATION, NEW YORK, NY, Bd. 1, Nr. 3, September 1998 (1998-09), Seiten 470-476, XP000879419 ISSN: 1044-1549 Seite 472, Spalte 2, Absatz 3 ---	1,2,5
A	MCLOUGHLIN L ET AL: "CHARACTERIZATION OF CIRCULATING PRO-OPiomelanocortin-RELATED PEPTIDES IN HUMAN SEPTIC SHOCK" JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, GB, BRISTOL, Bd. 119, Nr. 1, Oktober 1988 (1988-10), Seiten 159-165, XP000879345 ISSN: 0022-0795 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 161, Spalte 1, Absatz 2 ---	1,2,5
A	NYLEN E S ET AL: "PNEUMONITIS-ASSOCIATED HYPERPROCALCITONINEMIA" AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES, XX, XX, Bd. 312, Nr. 1, Juli 1996 (1996-07), Seiten 12-18, XP000879269 ISSN: 0002-9629 Seite 15, Spalte 1, Zeile 2 - Zeile 5 Seite 15, Spalte 2, Zeile 5 - Zeile 9 ---	1-10 -/-

INTERNATIONALES
FORSCHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07692

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ASSICOT M ET AL: "HIGH SERUM PROCALCITONIN CONCENTRATIONS IN PATIENTS WITH SEPSIS AND INFECTION" LANCET THE, GB, LANCET LIMITED. LONDON, Bd. 341, Nr. 8844, 27. Februar 1993 (1993-02-27), Seiten 515-518, XP000371780 ISSN: 0140-6736 Zusammenfassung ---	1-10
A	KARZAI W ET AL: "PROCALCITONIN - A NEW INDICATOR OF THE SYSTEMIC RESPONSE TO SEVERE INFECTIONS" INFECTION, DE, MMV MEDIZIN VERLAG, MUENCHEN, Bd. 25, Nr. 6, November 1997 (1997-11), Seiten 329-334, XP000879253 ISSN: 0300-8126 Seite 329, Spalte 2, Absatz 2 ---	1-10
A	DE 42 27 454 C (HENNING BERLIN GMBH) 3. Februar 1994 (1994-02-03) in der Anmeldung erwähnt Anspruch 1 ---	1-10
A	QURESHI, N.U. ET AL.: "Endogenous neuropeptide Y mediates vasoconstriction during endotoxic and hemorrhagic shock" REGULATORY PEPTIDES, Bd. 75-76, 25. September 1998 (1998-09-25), Seiten 215-220, XP000925467 Zusammenfassung Seite 215, Spalte 1 -Spalte 2, Zeile 3 Seite 219, Spalte 1, Absatz 3 ---	1-6
A	NORLANDER, T. ET AL.: "Effects of experimental Mycoplasma pulmonis infection on sensory neuropeptides and airway mucosa in the rat" EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, Bd. 10, 1997, Seiten 2334-2342, XP000925422 Zusammenfassung Seite 2341, Spalte 1, Absatz 2 ---	1-6
	-/-	

INTERNATIONALER **UCHERCHENBERICHT**

Inventur-Nr. / nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07692

C.(Fortsetzung) **ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KÜLLERTZ, G.: "Die Bedeutung der Aktivitätsbestimmung des Enzyms Dipeptidyl-Peptidase IV (DP IV) im klinischen Laboratorium" LAB.MED., Bd. 12, 1988, Seiten 123-130, XP000933866 Seite 123, Spalte 2 -Seite 124, Spalte 1, Absatz 1 Seite 125, Spalte 1, Absatz 2 - Absatz 3; Tabelle 4 Seite 128, Spalte 1, Absatz 2 Seite 129, Spalte 1, Absatz 4 - Absatz 5 ---	6
A	VANHAM, G. ET AL.: "Decreased Expression of the Memory Marker CD26 on Both CD4+ and CD8+ T Lymphocytes of HIV-Infected Subjects" JOURNAL OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROMES, Bd. 6, Nr. 7, Juli 1993 (1993-07), Seiten 749-757, XP000925435 Seite 751, Spalte 1, Absatz 6 Seite 753, Spalte 2, Absatz 3 Seite 756, Spalte 1, Absatz 2 ---	6
A	YARON, A. AND NAIDER, F.: "Proline-Dependent Structural and Biological Properties of Peptides and Proteins" CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 28, 1993, Seiten 31-81, XP000925565 Seite 55, Spalte 1, Zeile 15 -Spalte 2 Seite 56, Spalte 2, Absatz 2 -Seite 57, Spalte 1, Zeile 3 ---	1-6
A	ORAVECZ T ET AL: "REGULATION OF THE RECEPTOR SPECIFICITY AND FUNCTION OF THE CHEMOKINE RANTES (REGULATED ON ACTIVATION, NORMAL T CELL EXPRESSED AND SECRETED) BY DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV (CD26)-MEDIATED CLEAVAGE" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, Bd. 186, Nr. 11, 1. Dezember 1997 (1997-12-01), Seiten 1865-1872, XP002056059 ISSN: 0022-1007 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-6
	-/--	

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07692

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	P PROOST ET AL: "Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/Dipeptidyl-peptidase IV" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, Bd. 273, Nr. 13, 27. März 1998 (1998-03-27), Seiten 7222-7227-7227, XP002102982 ISSN: 0021-9258 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-6
T	WRENGER, S. ET AL: "Amino-terminal truncation of procalcitonin, a marker for systemic bacterial infections, by dipeptidyl peptidase IV (DP IV)." FEBS LETTERS, (JAN. 21, 2000) VOL. 466, NO. 1, PP. 155-159., XP002143500 das ganze Dokument -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07692

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

Aufgrund des Ergebnisses der vorläufigen Überprüfung
gemäß Regel 40.2(e) PCT ist ein Teil der zusätzlichen Gebühren zu erstatten.

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
	Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:
1. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von proGRP
2. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-END
3. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-BNP
4. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-ANP
5. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-Leptin
6. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-Neuropeptid
7. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-Somatostatin
8. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-ADM
9. Ansprüche: 1-10	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
	<p>Infektionen unter Verwendung eines Teilpeptids eines Prohormons, das durch Dipeptidyl-Aminopeptidase IV modifiziert wurde.</p>

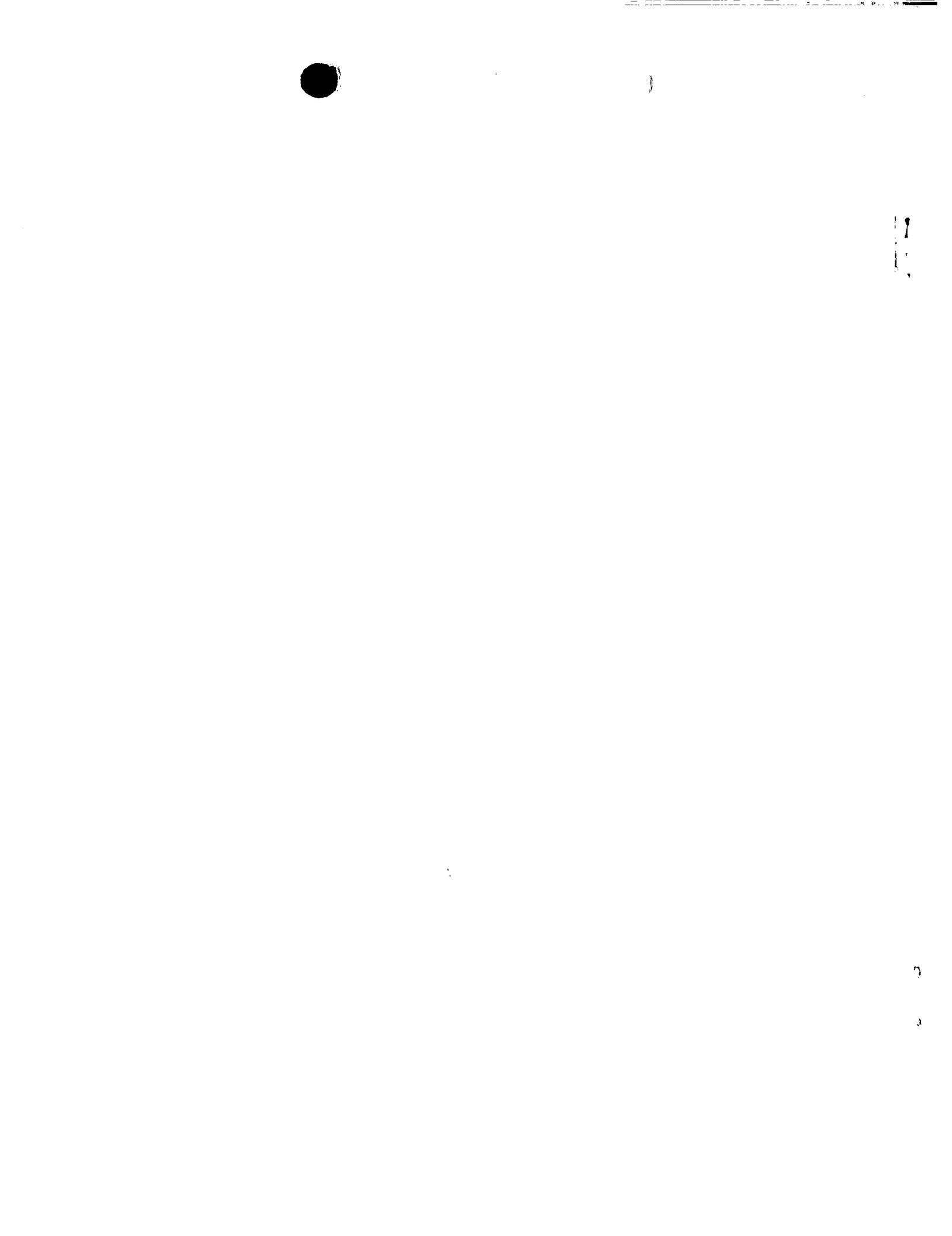
INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07692

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4227454	C	03-02-1994	
		AT 163767 T	15-03-1998
		AU 686114 B	05-02-1998
		AU 4951193 A	15-03-1994
		BR 9306928 A	03-12-1996
		CA 2142599 A	03-03-1994
		CN 1090928 A,B	17-08-1994
		DE 69317289 D	09-04-1998
		DE 69317289 T	08-10-1998
		WO 9404927 A	03-03-1994
		EP 0656121 A	07-06-1995
		ES 2114065 T	16-05-1998
		JP 8501151 T	06-02-1996
		MX 9305028 A	31-05-1994
		NO 950594 A	05-04-1995
		RU 2137130 C	10-09-1999
		SI 9300433 A	31-03-1994
		US 5639617 A	17-06-1997
		ZA 9306042 A	21-02-1994



**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie R. geln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 2892 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/07692	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/10/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/10/1998
Anmelder B.R.A.H.M.S. DIAGNOSTICA GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 9 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. Bestimmte Ansprüche haben sich als **nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 4

wie vom Anmelder vorgeschlagen

keine der Abb.

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07692

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

Aufgrund des Ergebnisses der vorläufigen Überprüfung
gemäß Regel 40.2(e) PCT ist ein Teil der zusätzlichen Gebühren zu erstatten.

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
	Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:
1. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von proGRP
2. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-END
3. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-BNP
4. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-ANP
5. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-Leptin
6. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-Neuropeptid
7. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-Somatostatin
8. Ansprüche: 1,2,5 (teilweise)	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen Infektionen unter Verwendung von pro-ADM
9. Ansprüche: 1-10	Verfahren zur diagnostischen Erkennung von Sepsis-ähnlichen

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
	<p>Infektionen unter Verwendung eines Teilpeptids eines Prohormons, das durch Dipeptidyl-Aminopeptidase IV modifiziert wurde.</p>

09/606437
Translation
1646

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

3ED

JUL 02 2001 JUN 02 2001

TECH CENTER

1600/2900

PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2892 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/07692	International filing date (day/month/year) 13 October 1999 (13.10.99)	Priority date (day/month/year) 15 October 1998 (15.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/74,		
Applicant B.R.A.H.M.S DIAGNOSTICA GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

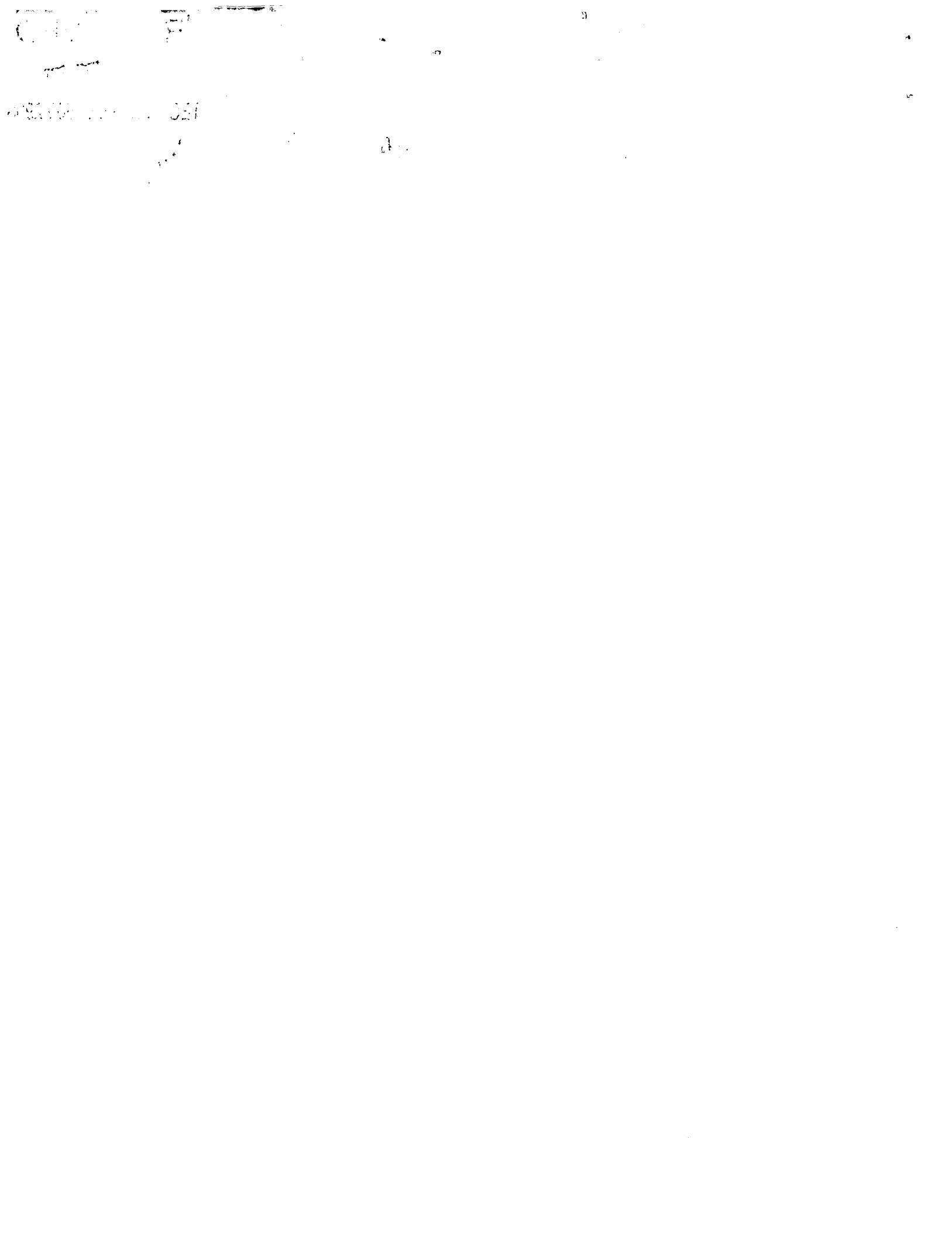
This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 08 May 2000 (08.05.00)	Date of completion of this report 19 January 2001 (19.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/07692

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

 the international application as originally filed. the description, pages 1-20, as originally filed,

pages _____, filed with the demand,

pages _____, filed with the letter of _____,

pages _____, filed with the letter of _____.

 the claims, Nos. 1-10, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. _____, filed with the letter of _____,

Nos. _____, filed with the letter of _____.

 the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 99/07692**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

The International Examining Authority agrees with the International Searching Authority that the present invention does not meet the requirements pursuant to PCT Rule 13.1 and 13.2.

The International Searching Authority has determined that there are two different inventions/groups of inventions.

The International Examining Authority identified a further invention/group of inventions, since the relationship of the measurement of a peptidase (Claim 6) to genetically engineered procalcitonin, its production and use is not clear (Claims 7 to 10).

The three inventions/groups of inventions are therefore a priori as follows:

- Group 1 with the common technical feature "prohormone, wherein procalcitonin is excluded" (Claims 1 to 5)
- Group 2 with the common technical feature "dipeptidylpeptidase" (Claim 6)
- group 3 with the common technical feature "procalcitonin 3-116" (Claims 7 to 10).

The applicant paid examination fees for two further inventions/groups of inventions, and the examination will therefore be carried out on the basis of all the claims.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP 99/07692
--

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	7-10	YES
	Claims	1-6	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: DE-C-4 227 454

D2: GASTROENTEROLOGY, vol. 110, no. 4, 1996, page A217

D3: AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 1, no. 3, 1998, pages 470-476

D4: LAB. MED, vol. 12, 1988, pages 123-130.

1. PCT Article 33(2) and (3)

1.1 The subject matter of **independent Claim 1** differs from the closest prior art (D1) in that peptide prohormones other than procalcitonin are determined. Claim 1 is therefore **formally novel** (PCT Article 33(2)).

The problem to be solved in relation to D1 is that of providing an alternative method for detecting sepsis and heavy infections.

This problem is solved in that prohormones other than procalcitonin are measured.

This solution is regarded as obvious in light of D1

in combination with D2 or D3, since both documents disclose a correlation of other prohormones to infection or sepsis:

D2 suggests that the serum-Pro-GRP content is increased by an *H. pylori* infection (abstract). D3 discloses an increased endothelin-1 content in sepsis (abstract; page 470, second column, second paragraph; page 474, first column, first lines). The endothelin-1 prohormone is measured (abstract). A person skilled in the art searching for an alternative method for detecting sepsis does not require, based on knowledge from D1, D2 and D3, an inventive input. **Claim 1 therefore does not meet the requirements of PCT Article 33(3).**

The same applies to the following dependent claims which disclose only features that are well known from prior art:

-**Claim 2:** D3, D3, abstracts

-**Claim 5:** D1, page 3, line 33: Immunoassay; page 4, lines 57-63: significantly increased procalcitonin level in sepsis.

1.2 The subject matter of **dependent Claims 3 and 4** is **novel** over the available prior art, since a "partial peptide, which differs from the known prohormone peptide by the absence of a dipeptide at the amino terminus," is determined for detecting sepsis.

The subject matter of the present Claims 3 and 4 is not inventive, however, since the description does not disclose any unexpected or surprising effect of these partial peptides in comparison with the known prohormone peptides (see, for example, description of D2 and D3 under 1.1).



1.3 The subject matter of independent Claim 6 is novel over D4, since a serum or plasma sample is tested.

D4 discloses a method in which body fluid of a patient with bacterial meningitis is tested. The authors explain that the clear increase in activity of DP IV in bacterial infection can be used diagnostically (page 129, first column, fourth - fifth paragraph). On page 123 (second column, last sentence), the possibility of DP IV measurement in blood plasma and serum is mentioned.

The technical problem to be solved is therefore that of providing an alternative method for recognizing sepsis and sepsis-like infections.

The problem is solved in that, instead of a body fluid sample, a serum or plasma sample of the patient is tested. The subject matter of **Claim 6 is not regarded as inventive** in light of D4. A person skilled in the art is regarded as capable of modifying the testing method of D4 for meningitis infections in such a way that other infections can be detected which are not detectable in body fluid.

1.4 The subject matter of **independent Claims 7 to 10** is **novel**, since none of the prior art documents discloses a procalcitonin 3-116.

This procalcitonin is shortened by 2 amino acids at the amino terminus in comparison with the generally known procalcitonin 1-116 (for example, D1, page 2, line 55).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/07692

This shortened procalcitonin, contrary to conventional procalcitonin 1-116 (D1, page 2, lines 60-63), is present in comparatively high concentrations in sepsis and appears to play an active role in this type of infection and in other inflammatory systemic infections.

The subject matter of the present **Claims 7 to 10** is **inventive**, since it was not derivable from any of the prior art documents, either alone or in combination.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/07692

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite D2 to D4 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

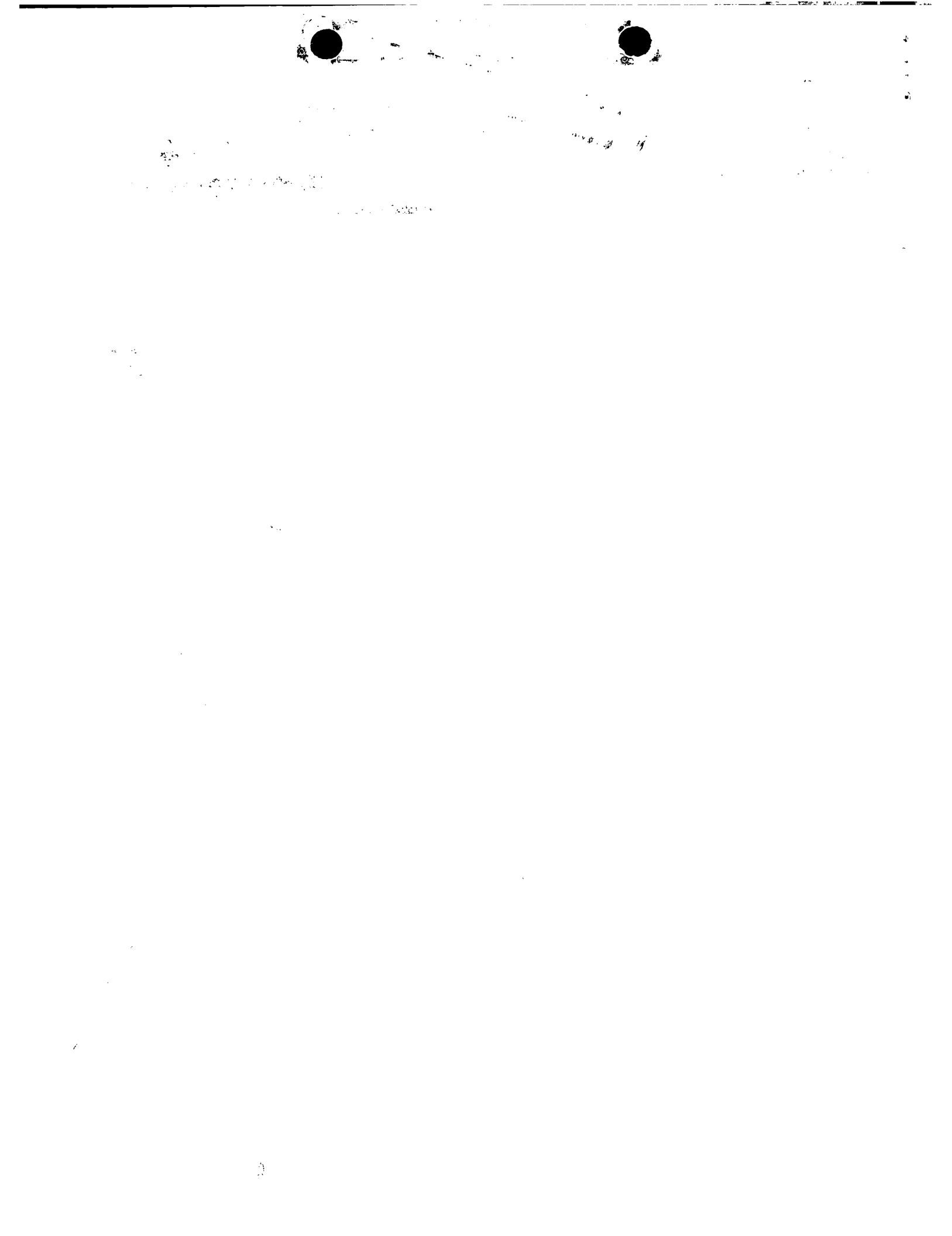
International application No.

PCT/EP 99/07692

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The method claimed in Claim 10 is not defined by technical features. This claim therefore does not meet the requirements of PCT Article 6.



T 4

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

RECD 24 JAN 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 2892 PCT	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07692	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 13/10/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 15/10/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/74		
Anmelder B.R.A.H.M.S. DIAGNOSTICA GMBH et al.		

<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p>
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input checked="" type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 08/05/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 19.01.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Maucher, C Tel. Nr. +49 89 2399 7415





**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07692

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.:*)
- Beschreibung, Seiten:**

1-20 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-10 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07692

- Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
- die Ansprüche eingeschränkt.
 zusätzliche Gebühren entrichtet.
 zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
- erfüllt ist
 aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
- alle Teile.
 die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründet Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuhit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07692

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-10
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	7-10
	Nein: Ansprüche	1-6
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-10
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Punkt IV:

Die mit der internationalen Prüfung beauftragte Behörde stimmt mit der internationalen Recherchenbehörde überein, daß die vorliegende Erfindung nicht den Erfordernissen von Regel 13.1 und 13.2 PCT entspricht.

Die internationale Recherchenbehörde hatte 2 verschiedene Erfindungen/Erfindungsgruppen festgestellt.

Von der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde wurde eine weitere Erfindung/Erfindungsgruppe identifiziert, da eine Verbindung von der Messung einer Peptidase (Anspruch 6) zu gentechnologisch hergestelltem Procalcitonin, seiner Herstellung und Verwendung nicht ersichtlich ist (Ansprüche 7-10).

Es resulieren daher a priori die 3 folgenden Erfindungen/Erfindungsgruppen:

- Gruppe 1 mit dem gemeinsamen technischen Merkmal "Prohormon, wobei Procalcitonin ausgenommen ist" (Ansprüche 1-5)
- Gruppe 2 mit dem gemeinsamen technischen Merkmal "Dipeptidylpeptidase" (Anspruch 6)
- Gruppe 3 mit dem gemeinsamen technischen Merkmal "Procalcitonin 3-116" (Ansprüche 7-10)

Der Anmelder hat Prüfungsgebühren für zwei weitere Erfindungen/Erfindungsgruppen bezahlt, so daß die Prüfung auf der Grundlage aller Ansprüche ausgeführt wurde.

Punkt V:

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: DE-C-4 227 454
D2: GASTROENTEROLOGY,
Bd. 110, Nr. 4, 1996, Seite A217
D3: AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY,



Bd. 1, Nr. 3, 1998, Seiten 470-476

D4: LAB.MED.,

Bd. 12, 1988, Seiten 123-130

1. Artikel 33(2) und (3) PCT

- 1.1. Der Gegenstand des **unabhängigen Anspruchs 1** unterscheidet sich vom nächsten Stand der Technik D1 dahingehend, daß andere Peptidprohormone als Procalcitonin bestimmt werden. Dadurch ist Anspruch 1 **formal neu** (Artikel 33(2) PCT).

Die zu lösende technische Aufgabe im Hinblick auf D1 ist es, ein alternatives Verfahren zur Erkennung von Sepsis und schweren Infektionen bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird gelöst, indem andere Prohormone als Procalcitonin gemessen werden.

Diese Lösung wird im Hinblick auf D1 in Kombination mit D2 oder D3 als offensichtlich angesehen, da beide Dokumente eine Korrelation anderer Prohormone mit Infektion oder Sepsis offenbaren:

D2 suggeriert, daß der Gehalt von Serum-Pro-GRP durch eine H. pylori-Infektion erhöht wird (Zusammenfassung).

D3 offenbart einen erhöhten Endothelin-1-Gehalt bei Sepsis (Zusammenfassung; S 470, 2. Spalte, 2. Absatz; Seite 474, 1. Spalte, erste Zeilen). Das Prohormon von Endothelin-1 wird gemessen (Zusammenfassung).

Der Fachmann braucht in Kenntnis von D1, D2 und D3 auf der Suche nach einem alternativen Verfahren zur Erkennung von Sepsis nicht erfinderisch tätig zu werden. **Anspruch 1 genügt daher nicht den Erfordernissen von Artikel 33(3) PCT.**

Dasselbe gilt für folgende abhängige Ansprüche, welche lediglich Merkmale offenbaren, die im Stand der Technik wohlbekannt sind:

- **Anspruch 2:** D2, D3, Zusammenfassungen

- **Anspruch 5:** D1, Seite 3, Zeile 33: Immunoassay; Seite 4, Zeilen 57-63:
signifikant erhöhter Procalcitoninspiegel bei Sepsis



- 1.2. Der Gegenstand der **abhängigen Ansprüch** 3-4 ist **neu** gegenüber dem verfügbaren Stand der Technik, da ein "Teilpeptid, das sich von dem bekannten Prohormonpeptid durch das Fehlen eines Dipeptids am Aminoterminus unterscheidet" zur Erkennung von Sepsis bestimmt wird.

Der Gegenstand dieser Ansprüche 3-4 ist jedoch **nicht erfinderisch**, da in der Beschreibung kein unvorhersehbarer oder überraschender Effekt dieser Teilpeptide im Vergleich zu den bekannten Prohormonpeptiden (siehe z.B. Beschreibungen von D2 und D3 unter 1.1.) offenbart wird.

- 1.3. Der Gegenstand des **unabhängigen Anspruchs 6** ist **neu** gegenüber D4, da eine Serum- oder Plasmaprobe untersucht wird.

D4 offenbart ein Verfahren, in dem Liquor eines Patienten mit bakterieller Meningitis untersucht wird. Die Autoren erklären, daß die deutliche Aktivitätserhöhung der DP IV bei bakterieller Infektion diagnostisch genutzt werden kann (Seite 129, 1. Spalte, 4.- 5. Absatz). Auf Seite 123 (2. Spalte, letzter Satz) wird auch die Möglichkeit der DP IV-Messung in Blutplasma, bzw. Serum, erwähnt.

Das zu lösende technische Problem ist daher die Bereitstellung eines alternativen Verfahrens zur Erkennung von Sepsis und sepsisähnlichen Infektionen.

Das Problem wird gelöst, indem statt einer Liquorprobe eine Serum- oder Plasmaprobe des Patienten untersucht wird. Der Gegenstand des **Anspruchs 6** wird im Licht von D4 **nicht als erfinderisch angesehen**. Der Fachmann wird als fähig angesehen, die Nachweismethode aus D4 für Meningitisinfektionen dahingehend abzuwandeln, daß andere Infektionen nachgewiesen werden können, die nicht im Liquor nachweisbar sind.

- 1.4. Der Gegenstand der **unabhängigen Ansprüche 7-10** ist **neu**, da kein Dokument des Standes der Technik ein Procalcitonin 3-116 offenbart.

Dieses Procalcitonin ist im Vergleich zum allgemein bekannten Procalcitonin 1-116 (z.B. D1, Seite 2, Zeile 55) am Aminoterminus um 2 Aminosäuren verkürzt.



Dieses verkürzte Procalcitonin, statt wie allgemein angenommen Procalcitonin 1-116 (D1, Seite 2, Zeilen 60-63), tritt in vergleichsweise hohen Konzentrationen bei Sepsis auf und scheint dabei und bei anderen entzündlichen systemischen Infektionen eine aktive Rolle zu spielen.

Der Gegenstand der vorliegenden **Ansprüche 7-10** ist ferner **erfinderisch**, da er aus keinem Dokument des Standes der Technik ableitbar war, weder allein, noch in irgendeiner Kombination.

Punkt VII:

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D2-D4 offenbare einschlägige Stand der Technik, noch diese Dokumente angegeben.

Punkt VIII:

Das in Anspruch 10 beanspruchte Verfahren wird nicht durch technische Merkmale definiert. Daher genügt dieser Anspruch nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT.

